

## ⑪公表特許公報(A)

平4-501959

⑫Int' CL  
C 12 N 15/11  
15/10  
C 12 Q 1/44

識別記号  
ZNA

序内整理番号

6807-4B※

⑬公表 平成4年(1992)4月9日  
審査請求 未請求  
予備審査請求 有 部門(区分) 1 (1)

(全 18 頁)

## ⑭発明の名称 核酸プローブ

⑮特 願 平2-501005

⑯⑰出 願 平1(1989)11月21日

⑭翻訳文提出日 平3(1991)5月21日

⑮国際出願 PCT/EP89/01419

⑯国際公開番号 WO90/06045

⑰国際公開日 平2(1990)6月14日

優先権主張 ⑭1988年11月21日 ⑮イギリス(GB)⑯8827157.2  
⑭1988年11月21日 ⑮イギリス(GB)⑯8827158.0

⑭発明者 ホーンズ、エリック

ノルウェー国、エヌ-0283 オスロ 2、リルアケロン 9ビー

⑭発明者 コースネス、ラース

ノルウェー国、エヌ-0375 オスロ 3、モノリットペイン 12

⑮出願人 ダイナル・エイ・エス

ノルウェー国、エヌ-0212 オスロ 2、スコーエン、ビー・オ

ー・ボツクス 158

⑯代理人 弁理士 山崎 行造 外2名

⑯指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH, CH(広域特許), DE(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

- 1 オリゴヌクレオチド分子を複数担持した、単分散、超常磁性粒子。
- 2 オリゴヌクレオチドが5'-アミノ基を介して粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 3 粒子がポリアクリル酸又はポリメタクリル酸のコーティングを有し、オリゴヌクレオチド上の5'-アミノ基との反応によって5'-アミド基を形成するカルボキシル基を与える、請求の範囲第2項に記載の粒子。
- 4 オリゴヌクレオチドが5'-アミノ基を介して粒子の表面に直接共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 5 オリゴヌクレオチドが、粒子上のアビジン又はストレプトアビジンに結合する5'-ビオチニル基によって粒子の表面に結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 6 オリゴヌクレオチドが、粒子表面上のヒドロキシル基に結合する3'-ヒドロキシル基によって粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 7 比重が1.1乃至1.8の範囲内である、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれか1項に記載の粒子。
- 8 サイズ範囲が1乃至10ミクロンである、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の粒子。
- 9 オリゴヌクレオチドが18乃至210塩基の範囲の鎖長を有している、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれ

か1項に記載の粒子。

- 10 オリゴヌクレオチドがポリdTである、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- 11 オリゴヌクレオチドが、標的核酸のDNA又はRNA配列に特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- 12 オリゴヌクレオチドが、標的核酸の族の保留領域に結合する、請求の範囲第11項に記載の粒子。
- 13 オリゴヌクレオチドが標的核酸に対しハイブリッド形成する配列及び、粒子に結合した、制限エンドヌクレアーゼ制限部位を含むリンカー配列を含む、請求の範囲第1項乃至第12項のいずれか1項に記載の粒子。
- 14 標的核酸を不動化し、前記核酸を溶液中で請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の粒子と接触させ、粒子上のオリゴヌクレオチドを前記標的核酸上のヌクレオチドに対してハイブリッド形成させる方法。
- 15 標的核酸がmRNAであり、粒子をその後磁気的に表面に凝聚させ前記溶液から分離する、請求の範囲第11項に記載の方法。
- 16 前記粒子上に不動化した標的核酸に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴヌクレオチドプローブを使用するポリメラーゼ連鎖反応による増幅処理を施し、ここで前記オリゴヌクレオチドプローブを担持した粒子がさらに存在しているか又はその後添加して、

増殖を可能にするのに十分な量の前記プライマーを与える、請求の範囲第12項に記載の方法。

## 11 一重鎖核酸の配列決定方法であって、

(a) 配列決定するオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を担持した通常磁性單分散粒子を製造する工程、

(b) (i) 粒子を4つのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオシドトリキスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスフェートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオシド又はジデオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、

(ii) 金粒子に、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、それぞれ異なるラベルを有する4つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なる鎖長と特定のジデオキシ塩基をともなった末端を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、

(c) ラベル付けされたDNA鎖を離離させ、大きさ毎にそれらを分別する工程、及び

は親和結合させる、方法。

## 12 オリゴヌクレオチドを、

(a) オリゴヌクレオチド上のビオチンと粒子上のアビシン又はストレプトアビシンとの反応

(b) オリゴヌクレオチド上のD'-アミノ基と粒子上のカルボキシル又はトシロキシ基との反応

(c) ヒドロキシル又はプロテクトされたヒドロキシル基を有する粒子上でオリゴヌクレオチドの直接化学的合成

によって結合させる、請求の範囲第13項に記載の方法。

## (4) 配列を決定する工程、

を含む方法。

13 標的核酸を単離及び/又は処理するためのキットであって、

(a) 請求の範囲第1項に記載の磁性粒子、及び以下に記載の:

(i) ポリメラーゼ

(ii) 逆転写酵素

(iii) 制限エンドヌクレアーゼ

(iv) 適当な緩衝液

(v) ジデオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを担持しているか又は担持するようには適合されているもの

(vi) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを担持しているか又は担持するようには適合されているもの

(vii) オリゴヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを担持しているか又は担持するようには適合されているもの

(viii) 標準的PEI 5'-プライマー及び/又は3'-プライマーであって、ラベル付けされていてもよいもののうちの少なくとも1つを含む、キット。

14 請求の範囲第1項に記載の磁性粒子の製造方法であって、所望により追加の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面上の官能基又は分子に共有又

## 明細書

## 核酸プローブ

本発明は新規な核酸プローブ及びそれらを調製し使用するための方法及びキットに関する。

核酸の生化学的操作においては、特定の核酸物質を複合混合物から単離しこれに非常に広範なプロセスを施すことが多い。標的(target)核酸の十分に長い配列が知られている場合、その配列に選択的にハイブリダイゼーション、その核酸の同定及び/又は単離に使用することができるオリゴヌクレオチドを設計することが特に有用であることが判明した。特に、そのようなプローブを不動化して、標的核酸を含む複合混合物との接触の際に標的核酸が選択的に不動化され、從って分離されるようになることが検査されている。

以前より、オリゴヌクレオチドを磁性粒子に結合させることが提案されている〔例えば、アドバンスト・マグネティックス(Advanced Magneetics)の米国特許第4672041号、アモコ・コーポレーション(Amoco Corporation)の欧州特許第216244号〕。しかしながら、これらは決して単分散ではなく、通常、適当な平均粒度まで微粉砕され、その後、オリゴヌクレオチドを含む問題の生体分子の範囲への結合を可能にする官能基をもたらす物質で被覆された磁性試験なら成っていた。さらに、このような磁性粒子は特に自動化された反応系では信頼性がなく、実用上好ましくないことが証明されている。

### 特表平4-501959(3)

特に、微粉砂によって製造された微細磁性粒子はしばしば磁気的凝聚に不適切に感応し、かなりの割合が結合した生体分子とともにサスペンション中に残留し、理論量よりも少ない生体分子の単離しか行われないことが判明している。本発明は、單分散超常磁性(mono-disperse superparamagnetic)粒子が以前に提案された磁性粒子よりも大幅に信頼性が高いということの発見に基づくものである。

本発明に従って、本発明者は、複数のオリゴヌクレオチドの分子を担持した單分散超常磁性粒子を提供する。

本発明の粒子は、標的一重鎖核酸に対するハイブリッド形成用のプローブとして使用でき、また前記オリゴヌクレオチドの塩基配列決定を可能にすることにも利用できる。

オリゴヌクレオチドは一重鎖DNAであるのが好ましいが、それはこれがRNAと一重鎖DNAの両方に對してハイブリッド形成し、かつRNAよりもかなり安定だからである。このようなDNAには、オリゴ-IT(これは自生真核生物のmRNA上に普遍的に存在するポリ(A)「テール[||||]」とハイブリッド形成する)及び標的RNA及びeDNA分子中の特定の配列とハイブリッド形成する特異的DNA配列が含まれ、又は塩基配列決定用のDNA分子でもよい。各プローブは、オリゴ-IT又は特異的DNA配列でよい一重鎖DNA配列が磁性粒子に直接結合したものから成ることができるが、

別の利点は、磁性粒子を使用して行われるハイブリッド形成又はその他のいかなるプロセスも、間隔をおいて粒子を磁気に凝集させ、粒子上の物質についてか又は上澄液中の物質に結び付いたラベル(::::::)を分析することによって、連続的にモニターすることができるということである。

磁気的凝聚を使用することによる粒子の分離は、核酸又は蛋白質を劣化させる可能性のある剪断力を生じる遠心分離のような従来的な分離技術よりもはるかに難易である。

磁性粒子は單分散でありかつ超常磁性であり、これらの特性は、粒子が含まれる反応の速度論に大きく寄与する。粒子に担持されたプローブが種々の反応において溶液中で実質的にまるで遊離状態であるかのように速く反応することは、本発明の驚くべき特徴である。従って、例えば、磁性粒子を使用する細胞溶解物からのmRNAの全単離を約15分以内に行なうことができるが、これに対しアフィニティカラム(:::::: column)を使用すると2時間である。單分散粒子、即ち、ほぼ同じサイズを有する粒子、を使用することによって、反応速度及びその他のパラメーターは特に均一である。超常磁性粒子(即ち、永久磁性を維持するのに必要な磁区(magnetic domains)の大きさよりも小さい強磁性体のサブ粒子を含む粒子)を使用することによって、反応中の粒子の凝聚(aggregation or clumping)を防ぐことができ、従って、

DNAの二重鎖部分を介して磁性粒子に結合していてもよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、合成及び自生のあらゆる鎖長のDNA及びRNA配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの鎖長は11乃至210塩基(::::)が好ましく、13乃至50塩基がさらに好ましい。オリゴ-IT配列と、特定の用途では、制限酵素部位(单数又は複数)とを含むプローブオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ・インク(Applied Biosystems, Inc.) (CA 14444, フォースターシティー・リンクーンセンタードライブ・150-T) 製の各装置、のいずれかを利用することによって最も簡単に製造することができる。

本発明によるプローブは、一般に、標的核酸の単離とその後の化学的及び/又は生化学的技術による操作において使用される。

磁性粒子を使用することによる幾つかの利点は明らかに陳立っている。磁性粒子は、標的核酸を含む混合物、例えば細胞エキス、に添加され、搅拌され、そして磁気的にリセプタクル(receptacle)の一方の側に引き寄せれる。液体はその後不要な成分とともに除去でき、そして、結合したRNAを有する磁性粒子は洗浄浴液中に再分散できる。洗浄工程はやつぎばやに数回繰り返すことができる。標的核酸を得る全工程を15分以内で行なうことができる。

これもまた均一かつ速い反応速度を確実にする。従って、粒子は磁場をかけることによって表面上に均一な速度で容易に凝聚させることができるが、例えば物理的搅拌によって、その後の熱処理に容易に再分散させることができる。反応の挙動及び素速さの均一性は特に自動化への道をもたらし、このことは、工業的製造及び/又は反復的プロセスにおいて必要な多くの核酸操作の必須要件である。最小限の人間の介入しかともなわない適当な機械によって、反応及び分離が完全な信頼性をもって行えるということは最も重要な事である。

本発明において使用するのに好ましい磁性粒子は、歐州特許第33901406.5号【シンテフ(::::::)】に従って製造される單分散超常磁性粒子であり、この引例の開示は本明細書中に含まれる。これらの粒子中には、鉄が非常に均一に分散しており、磁場に対する非常に均一な応答をもたらし、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、再現性のある方法、特にオートメーション、を設計する際に重要である。さらに、鉄の再現性のある量が各粒子に組み込まれているので、これを、以下で説明する範囲の粒子の比重を可能にする比較的低い濃度に調節することができる。従来の、規則性の劣った生成物においては、小粒子は、磁場がかけられた時にブラウン力(brownian force)を打ち消すには少なすぎる鉄しか含んでいないか、或いはその物質の比重はより大きな粒子への留まらない沈降を生じさせる。幾つかの自動化さ

特表平4-501959 (4)

れた装置は、粒子を反応領域内に保持し、一方溶液は流れていかせるのに、電場を使用している。この様な装置で使用するためには、磁性粒子の均一な磁気的及び粘弾性的性質は必須のものである。

本明細書中において使用される「単分散」という用語は、5%未満の直徑標準偏差を有するサイズ分散を意味するものである。

1.1乃至1.8の比重を有する粒子を使用するのが好ましく、1.3乃至1.5の比重が特に好ましい。本発明に従って使用される単分散粒子において、比重はここでも特に均一であり、均一で予想可能な速度論的特徴をもたらす。

単分散粒子は、少なくとも1ミクロン、好ましくは少なくとも2ミクロンの直徑の球状粒子であるのが適切であり、1.1ミクロン以下、好ましくは0.8ミクロン以下、例えば約0.8ミクロンの直徑であるのが好ましい。粒子が小さくなればなるほど沈降はゆっくりになり、沈降時間が反応時間に匹敵するほど長くなることもあり、従って物理的搅拌の必要性を省ける。しかしながら、従来技術で使用されているような、ずっと小さい直徑の微細粒子を含む平均直徑が1.1乃至1.5ミクロンの粒子は、磁化への応答において信頼性があるようには行動しない。

プローブの粒子への結合は、直接的化学結合並びにストレプトアビシン(streptavidin)／ビオチン(biotin)錯体などによる親和力結合でよい。

細孔を溝たし表面に所望の官能基を導入するためには、別のモノマーを細孔中及び表面で重合させる。好ましい種類の粒子の場合、表面は、 $-(CH_2CH_2O)-$ 結合を通してポリマー主鎖に結合している-OH基を有する。その他の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって得られた-COOH基を有する。

従って、例えば、粒子中に初めから存在しているOH基を、米国特許第444211号に記載されているようにジエポキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて末端ビニル基を設けてもよい。メタクリル酸との縮合共重合は、以下で言及するE111粒子のような、末端カルボキシル基を有するポリマー被覆を生じる。同様に、E111、E112、及びE113ビーズのようなジエポキシドとの反応の上記生成物をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方E150及びE151ビーズのように、アミノグリセロールのようなヒドロキシルアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ(Dynabeads) M-180(直徑1.8ミクロン)(これはノルウェー、オスロのダイナル社から得られる)は、单量体エポキシドで被覆されており、エポキシ基とヒドロキシ基の混合物をもたらす。しかしながら、水との接触はエポキシ基をヒドロキシ基に転換する。

ダイナビーズ M-181(直徑1.8ミクロン)は、3-トルエンスルホニルクロリドとの反応によってトシリキシ基(tosylixy group)に転換されているヒドロキシル基を有

するポリマーの結合用に、磁性粒子は、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、又はアミノ基を担持してもよい。一般に、これらは、被覆されていない單分散超常磁性粒子を処理して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの表面被覆を施すことによって設けられ、ポリマーの例は、ヒドロキシル基を与えるためのポリグリコールをともなうポリウレタン、ヒドロキシル基を与えるためのセルロース誘導体、カルボキシル基を与えるためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を与えるためのアミノアルキル化ポリマーなどである。米国特許第444211号は、このような表面被覆をたくさん紹介している。

本発明において使用するに好ましい被覆された粒子は、米国特許第444211号、第4459171号、及び第444211号に従う粒子の改質法によって製造でき、これらの引例の開示は本明細書中に含まれる。従って、例えば、ステレン-ジビニルベンゼンから製造され、1.15ミクロンの直徑を有するマクロ網状(macroporous)多孔質高分子粒子は、EIO<sub>2</sub>で処理され細孔の表面に-EIO<sub>2</sub>基が導入された。その後、粒子は、Fe<sup>2+</sup>の水溶液中に分散された。Fe<sup>2+</sup>は-EIO<sub>2</sub>基によって酸化され、これは細孔の内部に不活性の鉄オキシヒドロキシ化合物を析出させる。加熱後、鉄は、活性酸化鉄の微粉砂粒子として、細孔粒子全体にわたって存在する。IO<sub>2</sub>基はFe<sup>2+</sup>との反応によってIO<sub>3</sub>基まで還元される。

するポリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された被覆を使用することによって、DNA及び／又はRNAの非特異的結合が非常に低くなり、特に、カルボキシル化ビーズの場合にそうであることを本発明者らは発見した。

ハイブリッド形成したmRNAを次にcDNA合成に使用する場合、プローブとリリンクーはカルボキシル基を介して磁性粒子に結合しているのが好ましく、このDNAは初めにS'-末端アミノ基が供給され、これはカルボジイミドカップリング剤を使用してカルボキシルとアミド結合を形成させることができる。cDNAのS'-結合は、S'-アミノDNAと反応するようにCHITで活性化されたヒドロキシル化磁性粒子を使用して行うことができる。

オリゴヌクレオチドDNAのS'-結合もまた化学的合成によって行うことができる。ここでもまた単分散粒子の非常に均一な性質は、ジーン・アセンブラー(Gene assembler) [ファーマシア(Pharmacia) A/I 製] のような自動化された合成装置中での合成に特に適する均一な反応速度をもたらす。磁性粒子は、初めにヒドロキシル基又はプロテクトされたヒドロキシル基を供給されることを必要とする。ダイナルA/I 製のダイナビーズ M-180はこの目的によく適合する。しかしながら、必要な場合には、カルボキシルのようなその他の表面官能基を使用してヒドロキシル基を有するリンクー又はS'-結合ヌク

特表平4-501959(6)

レオチドを結合させることができる。

3'-結合は、3'-アミノオリゴヌクレオチドのトシリ活性化磁性粒子へのカップリングによって行ってよい。トシリ活性化磁性粒子は、ダイナル1/1型のダイナビーズ K-211のようなヒドロキシル化磁性粒子をトシリ化することによって製造できる。トシリキシ基の置換は、磁性粒子に直接結合した3'-アミノ基を残す。

しかしながら、プローブがmRNAの単離にのみ使用される場合には、プローブの3'末端が磁性粒子に結合してもよく、これは、DNAの3'-ホスフェート基と粒子上のアミノ基の間にホスホルアミド結合を形成させることによって簡便に行うことができる。

ビオチンラベルされたヌクレオチドは市販されているので、DNA断片の3'-末端はDNAポリメラーゼを使用して容易にラベル付けでき、これらは、例えばヒドロキシル基を介して磁性粒子に結合しているアビジン又はストレプトアビジンに簡便に結合できる。ビオチンラベルは、1つ以上のε-アミノカプロン酸部分のような、スペーサーアーム [191:192:193] によって、ヌクレオチドに結合させて立体障害を最小化できる。従って、例えば、二重鎖プラスミドが制限部位で切断され、各鎖の3'-末端にビオチンを与えるように、その末端にビオチニル化されたヌクレオチドを付けることができる。線状化された [191:192:193] プラスミドが、その後、別の制限部位で切断される場合、二重鎖DNAの部分は切除され、ストレ

プトアビジン被覆されたビーズに結合する可能性がある。ビオチニル化されていない鎖を除去するとビーズに結合した、ビオチンの結合したヌクレオチドが残る。

一般に、粒子を官能化し、その後のプローブを結合させるのが有利であり、各磁性粒子は11<sup>3</sup> ~ 10<sup>6</sup>のプローブを有する。(1 ~ 300 pmol/ml)。磁性粒子の均一なサイズは、プローブが粒子と反応する平均的なプローブ密度を確実にする点で有利である。均一なプローブ密度は、全てのプローブが、それらが使用される様々な手順において実質的に同じようにふるまうことを確実にする点で重要である。

酵素活性が、粒子の表面に非常に近いところ、例えば7ベース (11111) 以内、で起こりようであることは、本発明の顯著な特徴である。従って、もしE部位が後述するようなリンカー配列中に存在し、かつプローブがその後プライマーとして使用される場合、...cDNAと従って...cDNAを、DNAポリメラーゼによってE部位を越えて粒子表面に向かって合成でき、従って、それを適当なエンドヌクレアーゼによって容易に切断できることが判明した。本発明のカルボキシル化された粒子の場合、粒子のミクロ表面が非常に不規則であり、ハイブリッド形成とその表面近くでの酵素活性に対する立体障害を軽減できるような非常に大きな表面積を存在させていることが判明した。一方、このようなカルボキシル化された粒子への特異的結合は増加しない。

本発明による、オリゴヌクレオチドを担持している超常磁性单分散粒子は、広範囲の方法において使用できる。これらのいくつかを以下に記載する。

#### 1. mRNAを含む混合物からのmRNAの単離

真核細胞エキスからmRNAを得る従来の方法は、ディー・マニアチス (D. Maniatis) らによって教示されている【モルキュラー・クローニング (Molecular Cloning) : ラボラトリ・マニュアル (Laboratory manual)】、111 ~ 191ページ】。簡単に述べると、ポリデオキシチミジン (オリゴdT) を、親和性マトリックス、典型的にはカラム、を作るのに使用されるアガロースビーズ又はセルロースに結合させる。細胞エキスをカラムに通し、細胞エキスがカラムを通過するにつれて、mRNAのポリアデニレートテール (1111) がビーズ上に不動化されたオリゴdTに結合する。カラム洗浄し、その後mRNAをカラムから溶出させる。しかしながら、通常少なくとも2時間というそれに必要な時間のために、この方法は理想からはほど遠い。

mRNAの全ての鎖は、細胞溶解物中に存在するリボヌクレアーゼによって急速に加水分解する傾向にあるので、細胞の溶解後できるだけ速やかに単離し、cDNAに逆転写することが重要である。そうしないと、mRNAのかなりの割合が劣化し、完全な遺伝子のDNAに対応する全長のmRNAの位置を定めるの

が困難になる。細胞エキスからmRNAを分離する従来的方法を使用すると、mRNAがカラム上にいる間に多くの時間が費やされ、望ましくない劣化をもたらす。さらに、アガロース又はセルロースのカラムは汚染され、或いはさらにその他の細胞成分によって詰まり、容易に再使用できない。

本発明の目的は、mRNAを得て精製する迅速な方法を提供することである。

本発明の別の特徴によれば、RNAをその他の成分とともに含有する液体からRNAを単離する方法であって、

(i) 結合したオリゴヌクレオチドプローブを有する複数の超常磁性单分散粒子を前記液体に添加し、それによってRNAを前記プローブに対しハイブリッド形成させて前記粒子に結合させる工程、

(ii) 前記粒子を固体表面上に磁気的に凝集させる工程、及び

(iii) 液体とその他の成分を凝集した粒子から分離する工程、

を含む方法が提供される。

望ましくないRNAのランダムなハイブリッド形成を防ぎ、ハイブリッド化溶液の残りの成分の除去を完全にするために、磁性粒子は最初の磁気的分離の後少なくとも1回洗浄するのが好ましい。ランダムな部分相間にによって結合されたRNAを除去するために、こ

## 特表平4-501959(6)

の洗浄はストリンジエント (stringent) 条件下で、温度を上昇させるか又はハイブリッド化中に使用するよりも低い温度で、例えば 0.5% の塩化ナトリウム又は当量溶液 (equivalent solution) 、を使用することによって行ってもよい。

ストリンジエンシー (stringent) は通常プローブの長さと G+C 含有率によって計算される。プローブオリゴヌクレオチドと標的 mRNA の間の相同 (homology) が不正確である場合、洗浄は比較的小さいストリンジエント条件下で行うべきである。一般に、洗浄は、2 重 (double) の融点 (T<sub>m</sub>) より 12°C 低い温度で行われる。大体の T<sub>m</sub> は、上述のマニアテスの文献の 111~119頁からの以下の関係に従って簡便に計算できる。

$$(1) \quad T_m = [9.1 + 0.41 (G + C)] - 650/L$$

しはヌクレオチド中のプローブの平均長さに等しい。  
(1) この 2 重 DNA の T<sub>m</sub> は、誤って組み合わされた塩基対の数が 1% 増加するごとに 1°C 下がる。

$$(2) \quad (T_m)_{\text{obs}} = (T_m)_{\text{cal}} - 11.5 \log_{10} (\text{L}/L_0)$$

ここで、L<sub>0</sub> 及び L<sub>1</sub> は 2 つの溶液のイオン強度である。

小さいオリゴヌクレオチドに対しては、この融点は以下のように °C の単位で近似できる。

$$T_m = 2 \times (A + T \text{ 碱基の数}) + 4 \times (G + C \text{ 碱基の数})$$

ハイブリッド化反応は、1 M 塩化ナトリウム溶液又は本技術分野で公知の当量溶液中で行うのが好ましい。

【スクレイック・アシッド・ハイブリダイゼイション (Sucleic Acid Hybridization) 、ピー・ディー・ヘイムズ (P.D. Himes) 及びエス・ツェー・ヒギンズ (S. C. Higgins) 、アイアールエル・プレス (REL Press) 、1985、を参照のこと】。

プローブからの mRNA の除去は、適当な緩衝液、例えば、1 M TEA、中において 65°C で熱処理することによって行うことができる。

本発明の方法は、特定の mRNA フラクション又はさらに特定の mRNA 分子の分離の前の予備精製工程としてのように、細胞溶解液からの全ての mRNA 物質の分離に適用することができる。この目的のために、プローブはオリゴ-4T、即ち、例えば 11 乃至 100 碱基 (base)、好ましくは 11 乃至 50 碱基のような、比較的短いデオキシリボヌクレオチドの組、であるのが好ましい。このような組は、デオキシリボヌクレオチドの酵素的重合或いは、より短い組に対しては、自動化された DNA 合成又は従来的重合によって、容易にかつ安価に製造することができる。

オリゴ-4T は共有又は競和結合によって粒子に直接的に結合できる。この場合、ハイブリッド化された mRNA はその後加熱によって溶液中に遊離し、所望の緩衝液中所望の濃度の精製 mRNA の混合物を与える。

この実施態様の特別の利点は、もしそれが S. C. Higgins

を介して粒子に結合する場合、DNA プローブの 5'-末端はまた逆転写用のプライマーとして作用して一重鎖相補的 (complementarity) DNA (ss cDNA) を形成することが可能であり、ss cDNA はその後、所望により、本願出願人の英国特許出願第 1987158.1 号及び第 1987159.1 号に対応する本願と同日付けの日本出願（その内容は参考として本明細書中に組み入れられる）に従って、単離した mRNA に相補的な二重鎖 cDNA (dcDNA) を製造するのに使用できる。1 つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を有するリンクを介しての DNA プローブの 5'-末端の結合によって、このプローブ、合成された dcDNA は、制限酵素的切断によって粒子から遊離させることができ、粒子は磁気的に分離される。

しかしながら、本発明の別の実施態様によれば、プローブは標的 mRNA 分子に対して特異的である。

磁性粒子にカップリングされた特異的 DNA プローブの使用は、プローブとハイブリッド形成する共通の配列を有する mRNA 分子の簇 (islet) を単離する際に特に効果がある。従って、例えば、免疫グロブリンに対する mRNA のコーディングは、重い鎖と軽い鎖の一定の範囲からの DNA プローブを使用して回収する細胞エキスから単離できる。遺伝的に伝染する疾患の研究において、遺伝子の保存された配列 (conserved sequence) に対応するプローブを使用して一連の改良

された遺伝子から転写された mRNA を単離することができる。

### 2. 一重鎖 DNA の単離

本発明による磁性オリゴヌクレオチドは、mRNA の場合と実質的に同じ方法で、ss DNA を単離するのに使用できる。細胞溶解液のように、DNA がサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、該分離工程が初めて必要である。これについては、後述のポリメラーゼ反応の説明中で説明する。

ポリ-4T プローブを担持する本発明の磁性粒子は、特定の標的核酸配列 (specific target nucleic acid sequence) の分離に有利に使用することができる。標的核酸及びさらに、例えば、10~25 bp ユニットのポリ-4T テールの公知の配列に相補的な DNA 配列を含むプローブを合成できる。プローブは標的核酸とハイブリッド形成し、そしてラベル付けされたプローブは核酸の別の配列とハイブリッド形成する。その後、この三重複合体を捕獲するためにポリ-4T を担持している磁性粒子を使用でき、捕獲条件は、ポリ-4T とポリ-4T の間の水素結合のみが生じるようなものである。ポリ-4T とポリ-4T の間の比較的弱い結合は、例えば、加熱又はグアニジンチオシアネート緩衝剤による洗浄によって、容易に可逆的になる。従って、ハイブリッド化溶液からの磁性粒子の除去及び洗浄の後、三重複合体を粒子から溶出させることができ、さらに選択的

## 特許平4-501959(7)

に精製するために、1回以上のサイクルの精製処理を行うことができる。この技術は、過剰のラベルでラベル付けされた標的核酸の汚染、従来的分析システムにおける「ノイズ(noise)」の共通の源、を防ぐ点で特に有効である。

### 3. 一重鎖のRNA又はDNAの塩基配列決定法

DNAの塩基配列決定には2つの主要な方法、即ち、*Hassen-Gilbert* 法と*Sanger*ジデオキシ法がある。*Hassen-Gilbert* 法は、1本の鎖の5'末端でラベル付けされているDNAを用いて出発する。ラベル付けされたDNAは、その後、4つのタクレオチドの1つで優先的に切断される。条件は、平均して毎1本当たり1つの切断が起こるように選択される。与えられた塩基での切断用の反応混合物中において、各々の切断された鎖は、5'末端からその塩基用の位置の1つまで伸びる放射性断片を生成し、そのような断片は塩基の全ての位置に対して生じる。これらの断片は、例えば、PAGE及びゲルから成るオートラジオグラムによって分離される。切断された各塩基までの鎖長を測定することによって、全体の配列を決定できる。*Hassen-Gilbert* 法は 100 塩基以上の配列を決定するのに使用できる。

DNA塩基配列決定用の*Sanger*ジデオキシ法は、酵素的複製の制御された妨害に依存する。DNAポリメラーゼは一重鎖DNAの特定配列のコピーに使用され

る。この合成は、相補的断片によってプライムされる(primed)。4種のデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートに加えて、接合(ligation)混合物は、それらのうちの1つの5',3'-ジデオキシ相似物(ingot)を含む。このジデオキシ相似物又はデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートのうちのいずれか1つがラベル付けされる。この相似物は次のホスホジエステル結合を形成するに必要な5'-ヒドロキシ末端を欠いているので、この相似物の組み込みは新しい鎖がさらに成長するのを妨害する。従って、ジデオキシ相似物が5'末端にある様々な長さの断片が形成される。このような連鎖形成一停止(chained-terminal)断片群の4つの組(各々のジデオキシ相似物に対して1つずつ)をゲル上で電気泳動させて、4つのレーンのオートラジオグラムからDNAの塩基配列を読む。最近、ジデオキシ法の変種が考案され、これは蛍光性標識物のオリゴヌクレオチドプライマー、即ち、4つの連鎖停止反応混合物の各々の中で別々に着色されたもの、への結合を含む。これらの混合物はまとめて、一緒に電気泳動させる。それらが検出器を通過するとき、それらの蛍光によって、DNAの分離したバンドが検出される。この方法では 500 塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約 150 塩基のようなより短い配列が好みしい。

DNAのかなり長い配列は、この方法によって塩基

配列の決定をする前に、より小さい断片(100 ~ 150 塩基)に切断しなければならない。通常、配列データを正確に集めるためには、部分的に重なり合う断片が必要である。部分的に重なり合う断片の形成はDNA配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される塩基配列決定法の1つは、DNA配列クローニングを M13 ファージで形成するが、これは一重DNA鎖を与える。配列が 100 塩基対よりも長い場合、通常の方法は、初めの部分の塩基配列を決定し、このようにして得られた情報を使用して、次の 500 塩基部分用のプライマーを合成し、そしてこの手順をDNA鎖全体の塩基配列が決定されるまで繰り返す。しかしながら、テンプレートDNAを含む全てのDNA物質がゲル上に投入されなければならないので、各回毎にクローニング M13 ファージの新しいサンプルを使用する必要がある。核酸の大好きな片のサブ断片を形成する必要のない、核酸の塩基配列決定法に対する要望がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要望もある。

本発明のさらに別の面によれば、一重鎖核酸の配列決定方法であって、

(a) 配列決定すべきオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を担持する磁性性单分散粒子を調製する工程、

(b) (i) 粒子を4つのアリコートに分割し、各々のア

リコートに、ポリメラーゼ、混合タクレオシドトリホスフェート、及び1つのジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスフェートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオシド又はジデオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、

(ii) 全粒子に、ポリメラーゼ、混合タクレオシドトリホスフェート、それぞれ異なったラベルを有する4つの異なったジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、

を行うことによって、それぞれ異なった鎖長と特定のジデオキシ塩基をともなった末端を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、

(c) ラベル付けされたDNA鎖を遊離させ、大きさ毎にそれらを分別する工程、及び

(d) 配列を決定する工程、

を含む方法が提供される。

配列決定される一重鎖核酸はオリゴヌクレオチドであること、及び工程 (a) が本発明による結合されたオリゴヌクレオチドを有する磁性粒子の形成を含んでいることに注目すべきである。配列決定される一重鎖核酸がDNAである場合は、ポリメラーゼは

特表平4-501959 (B)

DNAポリメラーゼでよく、RNAである場合は、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼか又は逆転写酵素であることは認められるであろう。

サイズ分別時に断片の固定を確実にするために、プライマー配列は、それに結合したラベルを有してもよく、或いはタクレオシドトリホスフェート又はジデオキシ塩基は、例えば、放射性標示ラベル付けされてもよい。磁性粒子に結合したテンプレート核酸とcDNA断片の両方を磁性粒子とともに溶媒から磁的に分離し、cDNA断片を配列決定用緩衝剤中に還離させることによって、過剰のラベルを系から除去できることは、本発明の配列決定法の特徴の1つである。従来的配列決定方法においては、過剰なラベルが配列決定ゲルからの像(image)を妨害していた。

本発明による特に有効な方法の1つは、初めに、配列決定するDNAのクローニングベクター内で形成させて配列決定用のDNAを十分な量準備する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適当なE1部位で切断され、簡便にベクターの結合部分（これらは既に配列決定されている）を残して磁性粒子への結合に適する点を提供する。

二重鎖DNA配列が5'-ビオチニル化配列を介して粒子に結合している場合、それを変性させて、配列決定する。

ができる。

A. 配列決定されるDNA鎖は、5'ビオチニル化され、ストレプトアビシンを有する磁性粒子に結合してもよい。所望により、二重鎖DNAをこのようにして結合させ、その後、変性して配列決定に必要な一重鎖を与えてよい。これは、上溶液から単離されるべき分離した鎖が不動化された鎖で汚染されないようにでき、このもう一つの鎖は別側に配列決定して配列情報の確認を与えることができるこことは注目すべきである。プライマーはDNAの1'領域、既いで、上述のデオキシ及びジデオキシ塩基に約50塩基まで、ハイブリッド形成し、次の部分を配列決定するために上述したようにさらにプライマーが必要となる。

B. 配列決定されるべきDNA鎖は、磁性粒子に担持されているリンカーにハイブリッド形成でき、このリンカーは一重鎖DNAのループの形態であり、ここで、5'末端が1'-末端に近い領域でハイブリッド形成し、DNA鎖の1'末端領域に対応する粘着性(5'5'5')末端を残す。このようなループは、アミノ又はビオチン基を介して磁性粒子に結合することができ、これらの基は粒子に担持されたカルボキシル又はストレプトアビシン基とそれぞれ反応することができる。DNA鎖は、5'-末端で脱ホスホリル化され、その後、ループの5'-末端に配位して共有結合

するDNAを含み、接続プライマー部位を介して磁性粒子に結合している一重鎖を残すことができる。

上記のものに対して相補的なプライマーはアニール(anneal)でき、例えば、放射性ヌクレオチド及びポリメラーゼプライマー部分を加えアニーリングすることによってラベル付けできる。その後、上で概略を述べたような、サイズ分別を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、わずか約250の塩基に対して統計的、正確なサイズ分別を可能にする。これは、ジデオキシヌクレオチドのノーマルヌクレオチドに対する比率を調節することによって達成される。合成されたcDNA断片は、粒子上のDNAに客を与えること無く変性によって除去できる。その後、配列情報は、配列決定されるべき次の1連の塩基用の短鎖プライマーを設計するために利用できる。このようにして、非常に長いDNA鎖（例えば、2000塩基）が、部分毎に、従来的方法に見られる重複の問題に遭遇すること無く、塩基配列決定できる。

クローニングベクターに組み入れられているプライマー配列は、簡便には、従来的E1塩基配列決定において使用されている、いわゆる、「ユニバーサルプライマー(universal primer)」である。Iac I'遺伝子を有する全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、5'CTTAAACCGGGCCACTT'の配列を有している。

本発明の塩基配列決定方法は種々の形態を取ること

合を与えてよい。ループによって与えられたものに対応する粘着性末端を有する二重鎖DNAは、このようにして結合することができ、2つめの鎖はその後変性によって除去でき、E1塩基までの第1の部分を配列決定するためのプライマーとしてのループの5'-末端を残すことができる。

C. 磁性粒子は、DNAのある部分に対しハイブリッド形成するプローブを担持することができ、このプローブは第1の部分の配列決定をするためのプライマーとして役立つ。プローブに対してハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに対し5'であるのが好ましい。これは、後者のDNAが追加の末端DNA配列とともにベクターから切断される場合、共通に起こり得ることである。核酸がmRNAの場合、プローブは、自生異接mRNAのポリAテール(5'5')に対しハイブリッド形成する5'-結合オリゴ-DT配列でよい。或いは、例えば、mRNAの5'-末端配列が既に知られている場合、プローブは、mRNA中のある配列に対しハイブリッド形成する特異的DNA配列でもよい。

配列決定法がプライマーにラベルを担持することを要求する場合、プライマーとしても機能するプローブは、合成されたDNA鎖をラベルとともに粒子から切り離せるように、適当なE1部位を有していないければ成らない。この要件は方法2)及び3)の

## 特表平4-501959(8)

両方に通用される。しかしながら、プローブに共有結合せず使って合成されたDNA鎖とともに容易に分離する、分離ラベル化プライマーを単に使用することもできる。

4. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による標的核酸の増幅
- 標的DNA分子は、細胞溶解液又はその他の原料中に極めて少量でしか存在しないことが多く、配列決定の前にそのようなDNAを選択的に増幅(select)するためには、ポリマー連鎖反応(PCR)法を使用してもよい。標的DNAを増幅させるためにはクローニング工程を使用するよりもむしろPCR法が使用される。PCR技術においては、標的DNAの公知の配列に特異的な一对の重合プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが標的DNAテンプレートの全長まで伸びるDNA配列を生成するように、一方はコーディング鎖の5'末端又はその付近でハイブリッド形成し、他方は非コーディング鎖の5'末端又はその付近でハイブリッド形成する。このようにして製造されたDNAがその後、典型的には約95°Cでの熔融による、熱分離処理にさらされる場合、新たに形成した一重鎖DNA配列は混合物中に存在する過剰のプライマーに対しハイブリッド形成し、通常アニーリングに適する範囲まで温度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらにDNA鎖が合成されるが、今度は2つのプライマーの末端間しか伸びない。ポリメラーゼは、鎖分離

工程で使用される高温中で生き延びることができるのが好ましく、過剰の耐熱性ポリメラーゼ、すなわち、Taq Iが最近利用できるようになった。過剰の2つのプライマー及びDNA合成に必要な過剰のヌクレオチドが媒体中で維持される場合、別々の鎖が合成され、分離され、プライマーまでアニールされ、新しい鎖が合成され、これらがただ単に上記の各工程に対する最適温度の間で温度を上下させることによって行われる、反復循環プロセスを行うことができる。この方法においては、オリジナル標的DNAの増幅が指数関数的であり、濃度の数百万倍の増加が比較的短い時間で行うことができる事が判明した。

しかしながら、プライマーのその他のDNAへの非特異的結合と、それにより標的DNAに加えてその他のDNAが増幅されることによって、この方法は必ずしも十分に選択的ではない。プライマーの非特異的結合による、このサンプルDNAのランダムな部位の増幅は、標的DNAからのシグナルに比較してバックグラウンドのノイズを増加させる。多くの場合、このバックグラウンドノイズのレベルの増加は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子クローニングに関連して、このプライマーの非特異的結合の問題が、第1の対のプライマー中に入れ子になっている第2の対のプライマーを使用することによって解決できると提案されている。

4つの別個のプライマー化を要求することによって非特異的結合の大略な低減化が達成できる〔ムリス・ケー・ピー(Hillis, K. P.)、ケー・ファローナ・エフ・エー(K. Falona, F. A.)、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)(1987) 155: 335 ~ 351頁、及びライシュニク・エル・エー(Litchfield, L. A.)らのNuc. Acids Res. (1987) 15: 521 ~ 522頁、を参照〕。エンゲルケ・ディー・アル(Egelke, D. L.)らは、オリジナルのプライマーの一方に入れ子になっている、1つの新しいプライマーのみが、標的DNAのより大きくかつより一致した増幅をもたらすことができる事を示唆している〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 514 ~ 518頁〕。

本発明者らは、本発明の結合したオリゴヌクレオチドを有する磁性粒子がPCR増幅法におけるプライマーの1つとして使用できることを発見した。この反応の速度論は溶液中で見られるものに近い。入れ子になった第2のプライマーが使用される場合、本発明の粒子は第2のPCR相において使用することのみが要求される。各々の場合、増幅された全てのDNAは磁性粒子上に不動化され、過剰の反応体を除去するために容易に洗浄できる。増幅されたDNAが最後に除去できるように、粒子とオリゴヌクレオチドプローブ/プライマーの間に既部位又はその他の可逆的結合を設けるのが好ましい。

ビオチニル化プローブ/プライマーを使用するPCRを行うこともでき、また増幅DNAを単離するためにアビジン又はストレプトアビジンで被覆された本発明の磁性粒子を使用することもできる。

### 4. 標的DNAのラベル付けとその分析

英国特許出願第 8821151.1号に対応する本願と同日付けの本願出願人による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、標的核酸にラベル付けする方法であって、標的核酸の公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを担持した磁性粒子を標的核酸を含む混合物に加え、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び適当な塩基とともに使用して多數のラベル付けされたヌクレオチド塩基を組み入れたcDNAを合成する方法が記載されている。この方法は特に簡単で迅速であり、標的核酸を定量的又は定性的に分析するのに使用できる。

### 5. cDNAの合成

英国特許出願第 8821151.1号及び第 8827151.1号に對応する本願と同日付けの本願出願人による国際特許出願であって、その内容が参考として本明細書中に組み入れられているもの、には、オリゴヌクレオチドプローブを担持した磁性粒子を標的核酸に対してハイブリッド化させ、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び適当なヌクレオチド塩基とともに使用して、

cDNA鎖を合成させることによる、cDNAの合成が記載されている。この方法は、個々のcDNA分子を合成するために、又は存在する特定種の核酸の全て、例えばRNA中の全て、に対応するcDNAを製造するためには使用できる。

#### 6. 本発明の磁性粒子を使用する方法のためのキット

本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

##### A. サンプル中の全てのmRNAを単離するためのキット

- (i) オリゴ-dTを担持した本発明による磁性粒子及び1つ以上の

(i) ハイブリッド化緩衝液

(ii) 洗浄用緩衝液

##### B. サンプルから特異的mRNA又はcDNAを単離するためのキット

- (i) 特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による磁性粒子及び1つ以上の

(i) ハイブリッド化緩衝液

(ii) 洗浄用緩衝液

##### C. DNA又はRNA塩基配列決定用のキット

- (i) オリゴ-dT又は特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による磁性粒子

(ii) ポリメラーゼ及び1つ以上の

(iii) 適当な緩衝液

(iv) 洗浄用緩衝液

#### (ii) ジデオキシヌクレオチド dT、dA、dG、及びdC

- (i) デオキシヌクレオチド dT、dA、dG、及びdC
- (ii) ジデオキシヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチドであって、各々ラベルを担持しているか又は担持するように適合されているもの。

#### D. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用キット

- (i) 標的核酸の5'末端用の標準的特異的DNAプローブ/プライマーを担持した本発明による磁性粒子：

- (ii) 所望によりラベル付けされた標準的PCR 5'ープライマー：

(iii) 熱安定性ポリメラーゼ；及び1つ以上の

(iv) 適当な緩衝液；及び

(v) 制限エンドヌクレアーゼ。

以下の実施例は説明のためのみに与えられている。

#### 実施例1 (i)

##### カルボキシミド(BOC)で仲介された5'-III; プローブのカルボキシル位子への結合

- (i) プローブのカルボキシル粒子への結合に使用される反応は以下の通りである。チュウ(Cu)によって記載された[Cu]、L.C.T.及びオーゲル(Ogilvie)、L.L.、(1985) DNA 4、127～131]、1工程反応法を使用してプローブの5'-末端に導入されたアミノ基は、塩基

のアミノ官能性と比較して、アルキルリンカーの末端第1アミノ基のより大きな求核性をもたらす。従って、粒子上のカルボキシル基はこれらの第1アミノ基と優先的に反応することが予想された。

143カルボキシル粒子1mg当たり、1.1Mイミダゾール緩衝液pH7、0.1MEDCの100μl中の100μg 5'-III; 改質プローブを添加した。反応混合物を程やかに振盪しながら室温で24時間保った。

(i) III; 改質プローブをアプライド・バイオシステム・シンセサイザー(Applied Biosystem Synthesizer)とアミノリンク(Aminolink) IIを使用して調達した。カップリング反応は以下の通りであった。

143カルボキシル粒子1mg当たり、1.1Mイミダゾール緩衝液pH7の100μl中の100μg 5'-III; 改質プローブ、0.1M EDCAを添加した。反応混合物をローラーミキサー[コールター(Coltar)]上、室温で24時間保ち、その後 0.1M HCl (4)を含む10緩衝液中で洗浄した。

ハイブリッド形成(ハイブリダイゼーション)効率：個々の量の結合したプローブを有するある範囲の粒子を相補的 15 nmol ポリdTプローブを用いてハイブリッド形成実験において試験した。

粒子は、粒子1mg当たり1～250 pmol の結合したプローブをカバーしていた。

15 nmol ポリdTオリゴヌクレオチドの量を徐々に増加

させながら、徐々に増加する量の結合したプローブとハイブリッド形成させた。100 pmol が、結合した100 pmolを有する粒子に対してハイブリッド形成した。しかしながら、標的分子が1000 bp の範囲にあった場合【対照 mRNA、プロメガ・コーポレーション(Promega Corporation)】、結合したプローブを 100 pmol 有する粒子とより密度が高くカップリングした粒子とを比較してもハイブリッド形成効率に相違はなかった。

#### 実施例2

##### カルボキシミド(BOC)で仲介された5'-ホスフェート-プローブのアミノ粒子への結合

ゴーシュらによって記載された方法 [ゴーシュ、エス・エス(Gosch, S.S.) 及びムッソ、ジー・エフ(Musso, G.F.)、(1987) Anal. Lett. Lett. 18, 5331～5333] によって、プローブをホスホルアミド結合を介してS種の異なるアミノ粒子に結合させた。これらの異なる粒子に結合したDNAの量は、1.4～11.3マイクログラム/mgであった。

ポリエチレンジリコールリンカー(8原子)の末端にアミノ基を担持する143粒子は、より短いリンカー(3原子)上にアミノ基を担持する143粒子よりも多量のプローブと結合する。143粒子のようにリンカーをもっと長くすると(原子の数 20)、粒子に結合するプローブの量の減少が観察される。これはおそらくリンカーの二次構造によるものであり、これが末端アミノ基をカップ

## 特表平4-501959 (11)

リングに利用できなくなるのであろう。

非特異的に結合したDNAの量は、おそらく単位面積当たりのアミノ基の数によって、粒子間で異なる(7~11%)。E-111粒子は最も多くのプローブと共有的に結合するが(11 μg/ug)、これは最も低い非特異的結合しか示さない。

ホスホルアミド結合の既不安定性【チュー・ピー・シー・エフ(C.H., J.C.T.)、バール・ジー・エム(B.M. B.M.)、及びオーゲル・エル・イー(Oggle L.E.)、Ratl. Fields Res. 11、613~631】は、酸加水分解によって末端結合の程度を測定するのに使用される。末端結合プローブの量は、異なる粒子間で21~65%まで変化し、また、E-111粒子が65%の末端結合したプローブを有しており珍らしいようである。

本発明者らは、E-111、室温で24時間の代わりに、E-111の緩衝液中55°Cで3時間反応を行うことによって、E-111粒子に2倍のプローブ物質を結合させることができた。EDCのモル数を0.1Mから0.3Mまで増加させると、E-111粒子上のプローブの量が21%減少した(データは示されていない)。

### 一般的な方法

100 μl (6 μg) のオリゴA (36 mer) を、1 μl の0.1M イミダゾール、0.7、0.1M EDC に溶解させ、5 μg のアミノ粒子と混合し、55°Cで3時間保った。

### 実施例3

標準的小スケールカラム中、1.1ミクロンでカットオフするテフロンフィルターを設け、粒子を投入し、そしてカラムを組み立てた。

この粗持体はジメチルトリチル(DMT)基を含んでおらず、最初のサイクルの最初の工程でこのような化学物質が連結しない場合装置が停止するので、開始手順に小さい改良を導入した。DMT基が遊離するまで標準的 ABI 小スケールカラムを使用して合成を出発した。その後、ジーン・アセンブラーを手動で停止し、磁性粒子を含む改良カラムをジーン・アセンブラーに入れた。その後は装置の製造業者によって推奨されている標準的合成プログラムに従った。デプロテクション(deprotection)がファーマシアから推奨された。直接合成をオリゴ(47)<sub>25</sub> 及びカッパ軽鎖(light chain) 遺伝子のC領域からの以下の配列を製造するために使用した。

5'-TCATCTGGATGGGGAAAGATGGATAACAGTTGGTCCA-3'.

### 実施例5

#### 材料と方法

##### 磁性粒子

ダイナビーズ E-111ストレプトアビシン(ダイナル 1.1、Inv. 111、E-111 オスロ)を固体相として使用した。これらは、1.1 μg の直径を有しており、ストレプトアビシンと共有結合している単分散超常磁性ポリマー粒子である。これらは 1.1 μg / ml の表面積を有していた。

##### E-111プローブのトルク活性化粒子へのカップリング

アプライド・バイオシステム・DNAシンセサイザー 381A とアミノリンクIIを使用して、E-111基をオリゴヌクレオチドの5'末端に導入し、5'末端に第1E-111基を導入した。アミノリンクIIはアプライド・バイオシステム社から供給される。合成後これらのアミノ改質オリゴヌクレオチドは直接カップリング実験に使用された。

トルク活性化E-111粒子は、オスロのダイナル(Dynal)社から市販されている。

##### カップリング手順:

10 μl のトルク活性化粒子を、100 μl の1.5 M EDCPO4 中 5 μl E-111改質オリゴヌクレオチドと混合し、ローラーミキサー(コールター)上 37°Cで24時間保ち、その後 0.1 M HCl (1x) を含むTE緩衝液中で洗浄した。

### 実施例4

#### 直接合成

ダイナビーズ E-111粒子を使用した。これらは、直径が2.1ミクロンではなく1.15ミクロンであることを除いて E-111粒子と同じであり、E-111粒子と同様に表面上に第1-E-111基を含んでいる。

合成器【ファーマシア・ジーン・アセンブラー(Pharmacia Gene Assembler)】を使用して、DNAの5'末端を表面上に結合させた。

1.15ミクロンの粒子に適合させるために最小限の改良が必要であった。アプライド・バイオシステム社からの

##### ビオチン結合能力

1 μmol の<sup>14</sup>C-ビオチン [アマーシャム(Amersham)] を含む100 μl 6 x SSPE (ホスフェートとEDTAを有する標準的塩漬: マニアチス) を0.5 ugの粒子(6 x SSPEで予め洗浄したもの)に添加し、室温で15分間ローラーミキサー(コールター)に入れた。

6 x SSPE で2回洗浄した後、シンチレーション計測によって結合した<sup>14</sup>C-ビオチンの割合を測定した。

##### デオキシオリゴヌクレオチド

アプライド・バイオシステム・E-111 DNAシンセサイザー上でデオキシオリゴヌクレオチドを合成した。

化学薬品はアプライド・バイオシステム社から購入した。アミノリンクIIを使用して、5'アミノ改質デオキシオリゴヌクレオチドを製造した。

使用した免疫グロブリンカッパ軽鎖プローブは、5'-TCATCTGGATGGGGAAAGATGGATAACAGTTGGTCCA-3'であった。

##### プローブのビオチニル化

提供者によって推奨されたように、ビオチン E-111エステル【E-ビオチニルε-カプロン酸のクロンチック(Cletoic) E-スクシニミジル】を使用した。

10 μl の水中的 0.1 μmol E-111改質オリゴ(47)<sub>25</sub>を10 μl ラベル付け緩衝液(1 M ナトリウム炭酸水素塩/炭酸塩、pH 7.0)に添加し、搅拌した。

最後に、ジメチルホルムアミド中 15 μl のビオチン

## 特表平4-501959 (12)

1000 エステル ( $100 \text{ ml/ml}$ ) を添加して室温で一晩保った。

過剰のラベル付け剤と緩衝液を、セファデックス G25 スピニカラム (Sephadex G25 spin column) 中で除去した。  $\text{Klenow}$  のポリメラーゼ、 $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP、及びテンプレートとしてオリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>による反応中のフィル (filter) を使用して、 $\beta$ -ピオチンオリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>を末端ラベル付け (radiolabelled) した。過剰のラベルをセファデックス G25 スピニカラムを使用して除去した。

### オリゴ( $\text{dT}$ )ダイナビーズ (T-ビーズ) の製造

2.5 ml 6  $\times$  SSPE 中の  $100\mu\text{l}$  ピオチニル化オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub> ( $24 \text{ n mole}$ ) を、50 ml の予め洗浄したダイナビーズ M-200ストレプトアビジンと混合し、室温で15分間ローラーミキサー上で保った。

6  $\times$  SSPE 中で2回洗浄した後、ビーズを 6  $\times$  TE、1.1% SDS 中 4°C で保存した。

### オリゴヌクレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のバッチのハイブリッド形成能力を測定するための標準的分析において、エッペンドルフ (Eppendorf) 管中の 0.1 ml のビーズを 1  $\times$  SSPE、0.1% SDS で1回洗浄した。マグネットラック (MPC-E、ダイナル A.S.、オースロ) を各工程間に粒子を凝集させるのに使用した。

洗浄用緩衝液の除去後、50  $\mu\text{mol}$  のオリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub> と微量 ( $1 \sim 2 \times 10^5 \text{ cpm}$ ) の  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP-ラベル付けオ

リゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>を含むハイブリッド形成溶液 (6  $\times$  SSPE、0.1% SDS) を添加した。

軽やかに振拌した後、管を室温で2分間放置してハイブリッド形成させた。

ハイブリッド形成した粒子を室温で 2  $\times$  SSPE、0.1% SDS を用いて2回洗浄し、オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>に対してハイブリッド形成したオリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>のパーセントをシンチレーション計測器中で測定した。

### ポリ(A)mRNAトレーサーのラベリング

$\beta$ -ポリ A<sub>33</sub>テールを有する 1  $\mu\text{g}$  の 1200 bp mRNA (プロメガ) を、10  $\mu\text{l}$  1.5  $\times$  Klenow 緩衝液、1  $\mu\text{l}$  RN アシン (RNase), 10 mM DDT 中の 2.5  $\mu\text{mol}$  オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub> と混合した。室温で2分後、10  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP、1  $\mu\text{l}$  Klenow ポリメラーゼ (アマーシャム) 及び 10  $\mu\text{l}$  までの水を添加し、15°C で 60 分間保持を続けた。過剰の  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dATP をセファデックススピニカラムを使用して除去した。

### オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>と結合したダイナビーズ M-200ストレプトアビジンに対するポリ(A)mRNAハイブリッド形成用緩衝液

#### ポリ(A)結合緩衝液:

0.5M LiCl、10mMトリス-CI、pH 7.5、1 mM EDTA、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム。

#### 中間洗浄緩衝液:

0.15M LiCl、10mMトリス-CI、pH 7.5、1 mM EDTA、

非特異的結合を測定するための対照実験において、非相補的プローブ ( $1 \text{ nM}$  T-111プローブ) とカップリングした粒子は、粒子 1  $\mu\text{l}$ 当たり 10  $\text{n mole}$  オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub> 未調和結合しなかった。

### オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成速度論

磁気的に mRNA 単離実験を開始する前に、この系のハイブリッド形成速度論を研究することが必要であった。

相補的オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>標的ヌクレオチドに対して 2 倍過剰未調和の T-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成実験を組み立てた。

第1図が示すように、ハイブリッド形成は 1 分以内に完了した。

### オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成効率

どの程度効率的に標的核酸が混合物から分離できるかを試験するために、本発明者らは 2 つの異なる実験を組み立てた。

第1の実験においては、徐々に量を増やしながら幾つかの量の標的オリゴヌクレオチド (オリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>) を、公知の最大ハイブリッド形成能力 ( $10 \text{ n mole}$ ) を有する固定量 ( $100 \mu\text{l}$ ) の T-ビーズに添加した。第21図中の結果は、標的対ビーズ能力のモル比が 1 : 1 に近づいた場合でも、T-ビーズは少なくとも 99% の標的オリゴヌクレオチドと結合できることを示している。

第2の実験において、1  $\mu\text{mol}$  から  $100 \mu\text{mol}$  までの 5 つの異なる濃度のオリゴ( $\text{dT}$ )<sub>33</sub>を  $100 \mu\text{l}$  の粒子の

アリコートに添加した。各混合物中に存在する核酸の全量を、無因保のオリゴヌクレオチドを含むプローブで $10 \mu\text{g}$ まで調節した。標的オリゴヌクレオチドを含まない否定的対照実験においては、非特異的結合を検知できるように、非相補的プローブをラベル付けした。2分間のハイブリッド形成後、2段階の洗浄工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(*T*)<sub>25</sub>の量を測定した。第2回図中の結果は、 $100 \mu\text{l}$ のような低い標的オリゴヌクレオチド量(存在する全核酸の $0.001\%$ )でも、磁性オリゴ(*T*)<sub>25</sub>粒子は $95\%$ 以上を引き出すことを示した。

#### ポリA mRNAの磁気的単離

(*T*)<sub>25</sub>ダイナビーズ結合ポリA mRNAの能力、効率、および速度論を、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に関して記載したような類似の1組の実験を組み立てることによって研究した。

T-ビーズの最大ポリA mRNA結合能力を決定するために、3'末端に $30 \text{ A}'$ を有する $\lambda$ ヌクレオチドカナマイシン転写(プロメガ)である公知の濃度の<sup>33</sup>P-ラベル付けされた対照RNAを使用した。結合能力を決定するための方法は、オリゴヌクレオチド結合分析に関して記載したのと同様であるが、上述のハイブリッド形成緩衝液を使用した。

この特定のポリA<sub>25</sub>mRNAの結合能力は、T-ビーズ $1 \text{ mg}$ 当たり $11 \mu\text{g}$ ( $11 \mu\text{l}$ )のmRNAであることが判明した。

実験においては、 $10^6$ ハイブリドーマ細胞のアリコートを、可変量、 $100 \mu\text{l}$ 、 $100 \mu\text{l}$ 、 $50 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{l}$ 、のT-ビーズと、プローブなしの $100 \mu\text{l}$ のダイナビーズ $\lambda$ ECO-ストレプトアビシンに添加した。T-ビーズから切り離した後、ポリmRNAのノーザンプローフィング(Northern blotting)からのX線フィルムをデンシトメーターでスキャンし、免疫グロブリンカッパ経膜プローブで調査した。これらの結果は、mRNAの収量がビーズの量が増加するとともに増加し、一方上澄液中の残留mRNAがそれに対応して減少することを示している。第4回図中に提示されている結果は、約 $100 \mu\text{l}$ のT-ビーズが $10^6$ 細胞からの細胞質ポリA mRNAの $90\%$ より多くを単離するのに十分であることを示している。図中の記号△は粒子に対するハイブリッド形成を表し、記号○は上澄液中に残留しているmRNAを表す。プローブを有していないストレプトアビシン粒子は検知可能なmRNA結合を与えるなかった。

#### 実施例6

高純B-細胞系「ラジ(Raji)」(スウェーデン、ストックホルムのリー・クレイイン教授(Dr. L. Klein)から供給された)からのmRNAの精製

オーフレーらによって(Erl, J., Blocker, J., 197, 101 ~ 111 (1980)に記載されている方法によって、 $1 \cdot 10^6$ 細胞から全RNAを抽出した。この方法に従って、 $0.5 \text{ ml}$ の細胞ペレットを、 $5 \text{ ml}$ 氷冷分解(lysis)緩衝液(3

#### T-ビーズに対するポリA mRNAのハイブリッド形成の速度論と効率

オーフレーらの上述の方法を使用して、ハイブリドーマ細胞系(Raji) AB1(11)の $1 \times 10^6$ 細胞から全RNAを抽出した。オリゴ(*T*)粒子に対するmRNAハイブリッド形成の速度論を、 $100 \mu\text{l}$ の全RNAを微量の<sup>33</sup>P-ラベル付けされたマウスの脾臓ポリA mRNAとともに、そして $100 \mu\text{l}$ のハイブリッド形成緩衝液中の約5倍過剰のT-ビーズ能力を使用して、決定した。第3回図中の結果は、サンプル中のポリA mRNAの $90\%$ 近くが2分以内にビーズに対してハイブリッド形成し、また30秒後には $70\%$ が既にハイブリッド形成していることを示している。

#### 細胞質(cytoplasm)からのポリA mRNAの直接磁気的単離

ハイブリドーマ細胞系 AB1の培養液からの $10^6$ 細胞を一度洗浄し、 $50 \mu\text{l}$  PBS [ドゥルベッコ(Dulbecco's)、 $0.1\%$  BSA] 中に再分散させ、トリトン(Triton) X-100を $0.5\%$ の最終濃度まで添加した。1分間のリシス(lysis)の後、核酸を含む細胞デbrisを、エッペンドローフ(Eppendorf)遠心分離中で10秒間スピンドルをベレット化した。上澄液を、2倍濃度の $100$ ハイブリッド形成緩衝液中のT-ビーズに添加し、2分間放置してハイブリッド形成させ、その後粒子を磁気的に凝聚させた。ハイブリッド形成したmRNAを $2 \text{ mM EDTA}$ 中 $15^\circ\text{C}$ で粒子から切り離し、粒子を磁石を使用して除去した。この

$1 \text{ M LiCl}$ 、 $6 \text{ M 尿素}$ 、 $1.1\%$ サルコシル(sarcosyl)、 $1.1\%$ 2-メルカプトエタノール、 $50 \text{ mM Tris-HCl}$ 、 $10 \text{ M Li}^-$ 、 $5 \text{ mM EDTA}$ に添加した。その後、混合物を粗めに処理し、水上で一晩保持した。

翌日、分解液を $10,000 \times g$ で20分間遠心分離した。ペレットを速やかにTE-SDS( $1 \text{ mM Tris-HCl}$ 、 $1 \text{ mM SDS}$ 、 $0.1\%$ SDS)に溶解させ、同体積のフェノールークロロホルム(1:1)で1回抽出し、その後クロロホルムのみでもう1回抽出した。分解液を3倍体積のエタノールと $1/10$ 体積の $3\%$ BSAと混合し、 $10$ のバッチに分割し、そして使用するまで $-20^\circ\text{C}$ で保存した。

$1 \cdot 10^7$ 細胞に相当する全RNAのバッチの1つに、ミニアチスによってRajiに101 ~ 103頁に記載された方法に従って、オリゴ(*T*)-セルロールを使用する従来的mRNA精製法を施した。

全RNAのもう1つのバッチを以下のmRNA精製方法において使用した。

DNA合成器(アプライド・バイオシステムズ製)によって製造された、構造 $\text{5}'(\text{EB})_2(\text{CH}_2)_4-\text{GACCTGGCAATT}$   
 $\text{CCCCGGGCTCCAGT-(T)}_{25}$ を有するRITと命名されているDNAプローブを、 $10 \text{ ng}$ のRaji粒子、 $50 \mu\text{l}$ の前記DNAプローブ、 $1.5 \text{ ml}$ の $0.1\%$ イミダゾール緩衝液( $1.0 \text{ M Li}^-$ 中の $0.5 \text{ mM}$ のEDC(シグマ製))と混合することによって、(前述の)カルボジイミド法によって磁性粒子RITに結合させた。一晩保温し、TE(上述のもの)で2回粒

子を洗浄し、0.2 M NaOH、0.5 M HgCl<sub>2</sub> 中で1回洗浄して8 pmolのオリゴA<sub>17</sub>プローブをハイブリッド形成させる能力を与えた。1.5 ngの粒子を100 pmolのA<sub>17</sub>プローブ(キナーゼ(E. coli)反応によって<sup>32</sup>Pでラベル付けされている)と8×SSPE中で10分間保持することによって、ハイブリッド形成能力を測定した。<sup>32</sup>T(融点よりも12°C低い)において6×SSPEで2回粒子を洗浄した後、全添加量に対するハイブリッド形成したA<sub>17</sub>の割合をシンチレーション計測機で測定した。

mRNA精製の負の対照物として、配列

5'-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S'-NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-5'-TTTATTATCAGTTAACCTTCCTGT  
TGGACTTTGGGCTGAAGGAAAAAACC-3'を有すると命名されている無関係のプローブを上述の方法によって粒子と結合させた。

ラジ(<sup>32</sup>P)mRNAトレーサーを1.1 μlを用いて放射性ラベル付けすることによって調製し、mRNAを上述の従来法によって精製した。ラベル付けは、10 μl 5 μl Klenow ポリメラーゼ緩衝液(0.25 M NaCl、0.25 M Tris-HCl、pH 7.5、5 mM EDTA)中15°Cで10分間、1 pmolのBET-プローブをmRNAに対してハイブリッド形成させることによって行った。10 μl α-[<sup>32</sup>P] dATP(アマーシャム)、2単位のE. coliポリメラーゼを(BRL)をこの混合物に添加し、これを50 μlまで水で希釈した。2時間保持した後、混合物をセファデックスG-50(ファーマシア)に通して組み込まれなかったヌクレオ

チドを除去した。

mRNA精製実験は以下のように行った。

BET プローブを有する粒子1 ngを、100 μl 6×SSPE中100,000 cpmのトレーサー mRNAとともに、B細胞系ラジからの全RNAの10 μlに添加した。

同じ実験を行ったが、粒子はT<sub>4</sub>-プローブを有していた。

ハイブリッド形成は室温でローラーマシン(roller machine)上で行った。ハイブリッド形成反応の後、短い間隔で、磁石によって粒子を凝集させ、上澄液中の残留放射能を測定した。各測定の後、粒子をすぐに再分散させた。

10分後、mRNAの11%がBET プローブを有する粒子に結合した。対照粒子は検知可能な量のmRNAに結合しなかった。

10分間の保持後、粒子を室温で500 μl 2×SSPEで2回洗浄し、100 μl TE緩衝液中で再分散させ、粒子を凝集させ、上澄液を回収し、-20°Cで保存した。

#### 実施例7

本発明の方法を、本発明者らの研究所でクローニングしたりシン(rice) A 遺伝子の5'末端の塩基配列決定を行うために使用した。

DNA 断片上のリシンAを pRS3 中でクローニングした。この遺伝子の5'末端は以前に配列決定されている。プラスミド pAL100 をSalI 及び EcoRI を用いて切断し、

E. coli ポリメラーゼを使用して、存在する唯一のヌクレオチドとしてのビオチン-dUTP でビオチニル化した(Maniatis, 113 ~ 1116を参照のこと)。ビオチンは5'位においてのみ組み入れられる。第1のプライマーは公知の配列データに基づくものであり、5'-TGAT-ATP-GCA-GT-GCA-ATG-3'であった。

組み入れられなかったビオ-dUTP を除去するために、6%セファデックススピンカラムを使用して材料を精製し(Maniatis 166頁)、エタノールで析出させた(エタノールによる析出はおそらく省略できる)。ビオチニル化された二重鎖DNAを含む混合物を、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl 及び 1 mM EDTA, pH 8.0)中のストレプトアビシン/アビシン被覆磁性粒子と、室温で30分間程やかに反転(Revolution)させて、混合した。10 μl の粒子(25ng粒子/ml)当たり2 μl のビオチニル化DNAを使用した。

結合したビオチニル化二重鎖DNAを0.15 M NaOH中室温で5分間溶解させた。一重鎖DNAを有する粒子を磁石を使用して回収し、TE緩衝液中で1回洗浄した。

#### 配列決定反応

配列決定用プライマーのアニーリング：

2 μl の10倍反応/ハイブリッド形成(C100 mM、トリス pH 8.0、50 mM NaCl、MgCl<sub>2</sub>)

1 μl のT<sub>4</sub>-プライマー(1.2 μg/ml)

7.0 μl 蒸留水

を含む混合物を粒子に添加し、55°Cで5分間保持し、その後ゆっくりと室温まで冷却した。

アニールした粒子テンプレート-プライマーに以下のものを添加した。

[100 μl] dATP: 1.5 μl (20 μM, 300 Ci/m mol)

Klenow: 1.0 μl (4 U/μl)

BSA: 1.0 μl (100 μl (100 μg/ml))

<sup>32</sup>Pを代わりに使用できる。

全混合物を、A、G、C、及びTとラベル付けされた、4つのマイクロ遠心分離チューブ又はマイクロ滴定プレート中の液体浴め(ウェル(well))に分配した。即ち、(粒子の体積ために)各々4 μl ずつに分けた。

4 μl の適当なヌクレオチドを各チューブ/ウェル混合物、即ち、Aミックス(mix)、Gミックス、Cミックス、及びTミックスに添加した。

Aミックス: 100 μM dATP, dTTP, dCTP及び

100 μM dGTP

Gミックス: 5 μM dATP; 100 μM dTTP, dCTP及び  
12 μM dGTP

Cミックス: 100 μM dATP, dTTP; 10 μM dCTP及び  
100 μM dGTP

Tミックス: 100 μM dATP, 5 μM dTTP, 100 μM  
dCTP 及び 500 μM dGTP

混合物を室温で15分間放置して保った。

ジデオキシヌクレオチドで停止されていない全ての鎖の完全な合成を、125 μM の各ヌクレオチドを含む2 μl のデオキシヌクレオチド溶液、pH 7.0、を添加し、15分間さらに保持することによって行った。

5 μl のホルムアミド色素を添加し、沸騰水中で3分間加熱して、粒子からのラベル付けされたDNAを変性させることによって、反応を停止させた。その後、粒子テンプレートを磁気的に分離し、ラベル付けされたDNAを含む3 μl の上澄液を緩衝液勾配列決定用ゲル(buffer gradient sequencing gel)：アマーシャム(Amersham)からのプロトコール(Protocol)に入れた。

テンプレートを有する粒子は洗浄後再使用でき、前の配列決定からの配列決定結果に基づく新しいプライマー用にされる。

最初のプライマーは公知の配列データ、即ち、5'-TGA-ATT-GCA-CTT-GCA-AAG-3'に基づいた。

2つ次のプライマーは、この実験からの以下の配列データに基づいた：

プライマー 2 5'-G-AGA-TAG-CCT-CCT-CTA-G-3'

プライマー 3 5'-CCT-CTG-CAT-GAT-TTC-AG-3'

これら3つのプライマーを使用することによって、リシンA遺伝子中の最初の150の塩基の配列決定が可能であった。

対照として、K11を使用して同じ遺伝子の配列決定を行った。同じ結果が得られた。

dTTP、及び上述の11 μl の分解物サンプルから成っていた。2単位のTaqI-ポリメラーゼ(英國のアマーシャム(Amersham))を添加し、テクネ・プログラマブル・ドリーブロック(Teknion programmable Dri-block) PCR-1[テクネ、英國]を使用して、温度サイクル反応を行った。各サイクルは、95°Cでの1分間の変性工程、その後の50°Cでの2分間のDNAに対するプライマーのアニーリング、及び72°Cで1分間のTaqI-ポリメラーゼによるDNA鎖の伸長を含んだ。反応混合物を1滴のパラフィン油でカバーした。20サイクル後、混合物を100 μl のストレプトアビシン被覆磁性粒子に添加した。上澄液を除去し、不動化された二重鎖DNAを72°Cで0.15M NaOHで15分間保持することによって一重鎖形態に転換した。不動化されたテンプレートDNAを有するアビシン被覆粒子を統合して0.15M NaOHとTE-緩衝液で洗浄した。

マルチーリンカー領域からすぐ下流の領域に相補的な、蛍光末端ラベル付けされた配列決定プライマー(5'-CGTTGTAAACGCCACT-3')を使用して、配列決定反応を行った。2 μl の配列決定用プライマーを粒子に不動化されたテンプレートDNAと、10 μl のトリス-HCl(pH 7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μg/ml BSA及び100 μM のNaClを10 μl の全液体積まで含む緩衝液中で混合した。アニーリング混合物を85°Cで加熱し、室温まで冷却させた。1 μl のDTT/NaCl混合物(0.1 M NaCl/0.1 M DTT)及び4単位のT1-ポリメラーゼ(ファーマシア、ス

#### 実験例8

##### PCR増幅テンプレートを使用する固体相DNA塩基配列決定

磁性粒子上のストレプトアビシンへのビオチンによる不動化の前に側面配列をPCR法によって増幅したことについて、固体相塩基配列決定を前に概略を説明した技術に従って行った。合成ヒトプロインシクリン遺伝子断片を含むプラスミド pET111 を E. coli K11株に変形させ、寒天媒体上に広げた。脱脂されたバストールビベット(Pasteur pipette)で單一コロニーを取り、57 mM トリス-HCl、pH 10.0、16.6 mM Na<sub>2</sub>EDTA、5.7 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM β-メルカプトエタノール、及び100 μg/ml BSAから成るPCR緩衝液10 μl 中に懸濁させた。サンプルを85°Cまで5分間加熱し、室温まで冷却した後、1 μl の10×PCR緩衝液、pH 7.0、を添加して中和した。

マルチーリンカー領域の上流領域(ビオチン-CCATGAT TACCAATTAAATAC-3')及び下流領域(5'-TTCGATATCGGTAAAC CAGCACTCCATGTCATGG-3')のそれぞれに相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用してPCRを行った。製造者(スウェーデンのファーマシア(Pharmacia))が記載しているように上流プライマーを5'末端においてビオチニル化した。

反応混合物(100 μl)は、上述のPCR緩衝液、pH 7.0、1 μl の各プライマー、200 μM 每のdATP、dCTP、及び

dTTP、及び上述の11 μl の分解物サンプルから成っていた。この混合物の1.5 μl のアリコートを1.5 μl の各ヌクレオチド混合物と混合し、95°Cで10分間保持した。以下のヌクレオチド混合物を使用した：11 μl 每のdTTP、dCTP、dTTP、dATP、5.1 μM の各dNTP、51 mM のNaCl、及び41 mM のトリス-HCl pH 7.5。伸長(extension)反応の完了後、各反応の上澄液を除去し、ストレプトアビシンアガロースを水で洗浄した。10 mM EDTA、pH 7.5 0.3% (v/v) キシレンシアノール(cyanol) FF 及び0.3% (v/v) プロムフェノールブルー(Bromphenol blue)を含む脱イオン化ホルムアミドから成るホルムアミド/配列決定用色素の3 μl を使用して、新しく合成されたオリゴヌクレオチドを溶出させた。72°Cで15分間保持した後、上澄液を除去し、3 μl の水で希釈した。電気泳動(1%)中の蛍光バンド検知するように設定した自動化塩基配列決定装置に約2 μl を入れた。20 ts の分離長さ、及び7%ポリアクリルアミドゲルによる配列決定実験が明確な結果を与えた。この例は、PCR増幅されたDNAが磁性粒子上に不動化でき、T4DNAポリメラーゼと蛍光プライマーを使用して配列決定できることを示している。

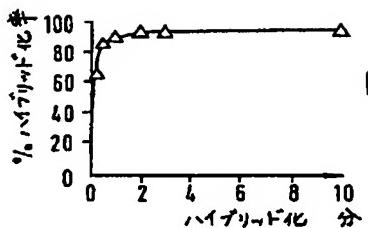


FIG. 1

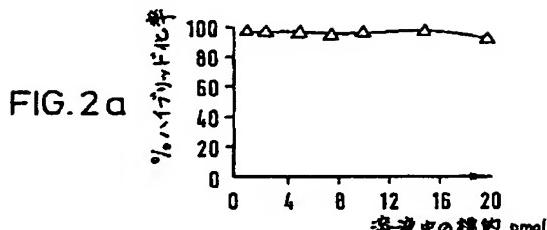


FIG. 2a

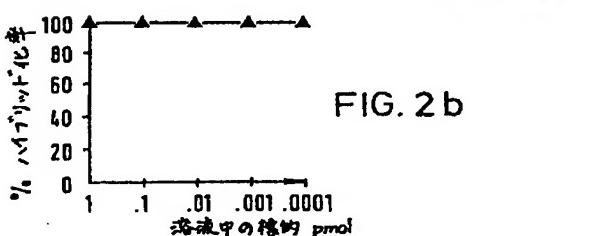


FIG. 2b

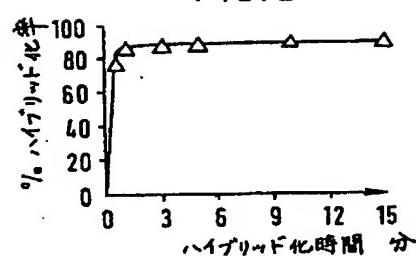


FIG. 3

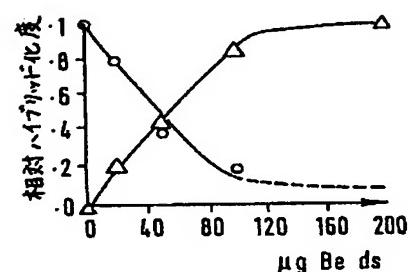


FIG. 4

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE RECORD SHEET)		
Category*	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the document number	Reference to Claim no.
X	EP, A, 0281390 (LYLE et al.) 7 September 1988 see the whole document	1,8-21
Y	--	2-7,19,20
P,X	WO, A, 89/04373 (BAXTER INTERNATIONAL INC) 16 May 1989 see the whole document	1,8-11
P,Y	--	2-7,19,20
X	WO, A, 88/05632 (ADVANCED MAGNETICS, INC.) 7 September 1988 see the whole document, especially pages 1-8,30,31; claims 1-7 & US, A, 4672040 (cited in the application)	1,9-11
Y	--	2-8,19,20, 10,15
Y	Nucleic Acids Research, vol. 16, no. 7, 1988, IRL Press Limited, (Oxford, GB); S. Stahl et al.: "Solid phase DNA sequencing using the biotin-avidin system", pages 3023-3038, see the whole article, especially page 3037, paragraph 2	1-11,17-20
Y	--	
Y	EP, A, 0230768 (STIMTEK INC.) 3 August 1987 see the whole document	1-11,19,20
Y	--	
Y	EP, A, 0224126 (THE UNIVERSITY OF CALGARY) 1 June 1987 see the whole document	13,17-20
	--	./.

特表平4-501959 (17)

International Application No. PCT/EP 89/01419

SEARCHED		INDEXED AND SERIALIZED AS PCT/EP 89/01418 (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
SEARCHED	SERIALIZED	INDEXED	SERIALIZED AS PCT/EP 89/01418
X	WO, A, 82/03674 (CARBONATEK AB) 5 May 1989 see pages 6,7; claims 7,8 --		1-8-11
A	US, A, 4654267 (UGGLSTAD) 31 March 1987 see abstract; column 7, line 64 - column 8, line 6 (cited in the application) --		1
A	US, A, 4336173 (UGGLSTAD) 22 June 1982 see abstract; column 7, line 64 - column 8, line 16; example 17 (cited in the application) --		1
X	Chemical Abstracts, vol. 108, no. 23, June 1988, (Columbus, Ohio, US), J. Ugelstad et al.: "Biomedical applications of monodisperse magnetic polymer particles", see page 332; abstract 201011, 2 MACRO AFM Ser., Ser. E 1987, 132 (Future Dir. Polym. Colloids), 155-70 --		1-8
X	EP, A, 0125995 (ADVANCED MAGNETICS, INC.) 11 November 1984 see the whole document, especially page 12, lines 26-29 & US, A, 4672040 (cited in the application)		1-8-11
V	--		2-7,10-35, 19,20
V	EP, A, 0200362 (CHINT CORP.) 10 December 1986 see abstract --		16

From PET/100 kg DWL were shown in Appendix 1990)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, " See abstract, when necessary, M and Numbers elsewhere"	Reference to Class List
Y	US, 4775619 (CHION CORP.) 4 October 1988 see abstract; figure 1	13
P,Y	WO, A, 89/11546 (G. PAULSEN) 30 November 1989 see the whole document	1-19
T	WO, A, 89/09282 (M. HOLMES) 5 October 1989 see the whole document	1-19

Peru ACT/USA 2000-0001 Country Code

Document Generated on: 05/05/2023 03:11:15

**FOR CHARTING YOUR ENTREPRENEURIAL FUTURE THE PRACTICAL GUIDE**

PROTECTED INFORMATION CONTAINED IN THIS DOCUMENT IS UNCLASSIFIED

---

**V-1 OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE NOTIFICATION UNREASONABLE**

The International Search Report has not been completed in respect of certain claims under Article PCT/Article 16(1) for the following reasons:

Claim number: \_\_\_\_\_ indicates they relate to subject matter not disclosed or claimed by this document, namely:

Claim number: \_\_\_\_\_ indicates they relate to state of the international application that do not properly with the prescribed means to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim number: \_\_\_\_\_ indicates they are dependent claims and are not claimed in accordance with the general and specific provisions of PCT Rule 4(a).

**V-2 OBSERVATIONS WHERE STATE OF INVENTION IS UNKNOWN \***

The International Searching Authority found certain inventions to be the international application or (if more than one):

- 1.- Claims (1-9,11,13,14,19,20)\*,10,15
- 2.- Claims (1-9,11,12,14,19,20)\*,13
- 3.- Claims (1-9,11,12,14,19,20)\*,16
- 4.- Claims (1-9,11,12,14,19,20)\*,17,18

\* ) Partially

An all-round international search was not fully paid by the applicant, the International Search Report being issued at maximum charge of the International application.

As only some of the claimed inventions were fully paid by the applicant, the International Search Report covers those claims of the International application for which fees were paid, respectively claimed.

The required international search fees were already paid by the applicant. Consequently, no international search would be requested for inventions that remained in the claims if it is covered by other applicants.

An all-round international search was not fully paid by the applicant, the International Searching Authority will request payment of the remaining fees.

Details on PCT fees:

The international search fees were communicated by my office.

No funds representing the payment of additional search fees.

Peter PETRAKOVIC (1900-1978) - 1965 - 1978

Digitized by srujanika@gmail.com

Page 17 of 20

### Motivation

The present invention teaches the use of monodispersed superparamagnetic particles associated with a plurality of nucleic acid molecules in hybridization reactions. For the subject matter to form a unitary concept, it would be necessary that the general inventive concept as disclosed should not have been disclosed in the prior art. In this regard, the general problem underlying the invention is not novel and a solution to it has already been found in the state of art as illustrated by EP 0265244. This document teaches the use of superparamagnetic particles associated with at least one nucleic acid probe molecule and which are capable of substantial homogeneous dispersion within a sample medium; the beads are spherical and generally have a diameter of one micron, see page 4, lines 15-44, and page 6, lines 7-10. By describing the particles as capable of substantial homogeneous dispersion EP 265244 explicitly describes a dispersion whose properties are substantially uniform in nature, i.e. the dispersion comprises substantially similar or substantially identical parts or elements in accordance with the lexical usage of substantially homogeneous. Thus EP 265244 defines particles whose qualitative properties fall within the scope of those defined herein, the quantitative characteristics of which are not claimed.

Indeed, in US 4454276 and US 4336173, both of which are incorporated in the application by reference, as indicated in the search report, the same consideration is used loosely to describe particles having approximately the same size, for instance a standard deviation of less than 15% as in US 4454276 (column 8, lines 1-9) and in US 4336173 (example 17, line 6) the term monodisperse is used for particles having a standard deviation of less than 10%. Therefore, the diversity of solutions proposed for the problem (as originally stated and resolved) no longer conforms to a common inventive concept. The search has been restricted, as a result, to the first topic described.

Punto PCTCIA

特表平4-501959(18)

国際調査報告

EP 8901419  
SA 32921

This notice lists the patent family members referred to in the patent documents cited in the above-mentioned International search report.  
The numbers are as recorded in the European Patent Office EPO file on 14/02/91.  
The European Patent Office is in no way liable for those portions which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family members	Publishing date
EP-A- 0265244	17-04-88	AU-A- 8005757 JP-A- 63182399 ZA-A- 8707772	28-04-88 03-05-88 20-04-88
EP-A- 0281190	07-09-88	AU-A- 1425958 JP-T- 1502219 MO-A- 8804433	28-07-88 17-08-88 07-07-88
MO-A- 8904373	18-05-89	AU-A- 2795689 DE-A- 1836475 EP-A- 0344270 JP-T- 1501753	01-06-89 03-05-89 06-12-89 14-06-90
MO-A- 8906632	07-09-88	US-A- 4554088 CA-A-, C 1284022 EP-A- 0344270 GB-A- 2357755 JP-A- 60001564 US-A- 4628037 US-A- 4655392 US-A- 4695193 US-A- 4698102 US-A- 4672040	19-11-88 18-05-89 06-12-89 14-05-90 07-01-85 09-12-86 22-09-87 22-09-87 08-10-87 09-08-87
EP-A- 0210768	05-09-87	AU-A- 601286 AU-A- 6675386 JP-A- 62190466 US-A- 4925147	15-09-87 25-06-87 20-06-87 19-06-90
EP-A- 0124126	03-06-87	JP-A- 63219380	13-09-88
MO-A- 8903674	05-05-89	SE-A- 8704158	27-04-89
US-A- 4654267	31-03-87	AU-A- 4660879 AU-A- 1476583 EP-A-, B 01056573 MO-A- 8303970 US-A- 4774255 US-A- 8402031	16-04-87 21-11-83 02-05-84 10-11-83 27-09-88 24-05-84

国際調査報告

EP 8901419  
SA 32921

This notice lists the patent family members referred to in the patent documents cited in the above-mentioned International search report.  
The numbers are as recorded in the European Patent Office EPO file on 14/02/91.  
The European Patent Office is in no way liable for those portions which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family members	Publishing date
US-A- 4336173	22-06-82	AT-D- 239169 AU-B- 530410 AU-H- 4415279 CA-A- 1165779 EP-A, B 0001909 JP-A, B, C 54155288 US-A- 4453378	22-09-82 14-07-83 10-09-79 01-05-84 05-09-79 01-10-79 10-07-94
EP-A- 0125995	21-11-84	US-A- 4554088 CA-A-, C 1284028 EP-A- 0317531 JP-A- 60001564 MO-A- 8806432 US-A- 4428037 US-A- 4655372 US-A- 4695393 US-A- 4698302 US-A- 4672040	19-11-85 18-05-89 14-03-90 01-01-85 07-09-88 09-12-88 22-09-87 12-05-87 08-11-87 09-08-87
EP-A- 0200362	09-11-86	US-A, B 4581202 US-A- 4581195 AU-B- 5863113 AU-A- 1532296 AU-B- 891104 AU-A- 1532288 CA-A- 1827190 EP-A- 6202184 JP-A- 62000281 JP-A- 61274657 US-A- 4800159	22-07-87 22-07-87 04-07-89 01-10-86 30-11-89 02-10-88 15-11-88 15-11-88 05-01-87 04-12-86 24-01-89
US-A- 4775619	04-10-88	None	
MO-A- 8911546	30-11-83	AU-A- 1562289	12-12-89
MO-A- 8907212	05-10-89	AU-A- 3350283 EP-A- 0406296	16-10-89 09-01-91

For more details about this notice, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

For more details about this notice, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

第1頁の続き

④Int. Cl.<sup>1</sup>  
C 12 Q 1/48  
1/68

識別記号 庁内整理番号  
Z 6807-4B  
A 6807-4B

- 優先権主張 ②1988年11月21日②イギリス(GB)②8827159.8  
②1988年11月21日②イギリス(GB)②8827160.6  
②1988年11月21日②イギリス(GB)②8827166.3  
②1988年11月21日②イギリス(GB)②8827167.1  
②1989年3月22日②イギリス(GB)②8906643.5

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成9年(1997)3月11日

【公表番号】特表平4-501959

【公表日】平成4年(1992)4月9日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-501005

【国際特許分類第6版】

C12N 15/11 ZNA

15/10

C12Q 1/44

1/48

1/68

【F I】

C12Q 1/44 7823-4B

1/48 Z 7823-4B

1/68 A 9453-4B

## 手 続 補 正 書

## 訂 正 明 細 書

平成8年10月14日

特許庁長官 聞

1 事件の表示

平成2年特許願第501005号

2 発明の名称

検査プローブ

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ダイナル・ニイ・エス

4 代理 人

住 所 東京都千代田区永田町1丁目11番28号

相互永田町ビルディング 8階

電話 3581-9871

氏 名 (7101)弁理士 山崎 行造

司 所

氏 名 (7603)弁理士 木村



平成  
8年  
10月  
14日

5 拒絶理由通知の日付

平成 年 月 日 (発送日)

6 補正の対象

明細書

7 補正の内容

別紙の通り。

## 1 発明の名称

検査プローブ

## 2 特許請求の範囲

- 1 オリゴヌクレオチド分子を複数組合した、単分散、超荷電性粒子。
- 2 オリゴヌクレオチドが5'-アミノ基を介して粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 3 粒子がポリアクryル酸又はポリメタクリル酸のコーティングを有し、オリゴヌクレオチドとの5'アミノ基との反応によって5'アミド基を形成するカルボキシル基を与える、請求の範囲第2項に記載の粒子。
- 4 オリゴヌクレオチドが5'-アミノ基を介して粒子の表面に直接共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 5 オリゴヌクレオチドが、粒子上のアビジン又はストレプトアビジンに結合する5'-ビオチニル基によって粒子の表面に結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 6 オリゴヌクレオチドが、粒子表面上のヒドロキシル基に結合する3'-ヒドロキシル基によって粒子に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 7 比重が1.1乃至1.8の範囲内である、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれか1項に記載の粒子。
- 8 サイズ範囲が1乃至10ミクロンである、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の粒子。
- 9 オリゴヌクレオチドが12乃至200塩基の範囲の長さを有している、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- 10 オリゴヌクレオチドがオリ4Tである、請求の範囲第1項乃至第9項のいずれか1項に記載の粒子。
- 11 オリゴヌクレオチドが、複数核酸のDNA又はRNA配列に特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。

- 12 オリゴヌクレオチドが、標的核酸の族の保存された領域に結合する、請求の範囲第11項に記載の粒子。
- 13 オリゴヌクレオチドが標的核酸に対しハイブリッド形成する配列及び、粒子に結合した、創設エンドヌクレアーゼ剝離部位を含むリンカーパリエートを含む、請求の範囲第1項乃至第12項のいずれか1項に記載の粒子。
- 14 標的核酸を不動化し、前記核酸を液中で請求の範囲第1項乃至第13項のいずれか1項に記載の粒子と接触させ、粒子上のオリゴヌクレオチドを前記標的核酸上のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成させる方法。
- 15 標的核酸がmRNAであり、粒子をその後核酸的に表面に凝集させ前記溶液から分離する、請求の範囲第12項に記載の方法。
- 16 前記粒子上に不動化した標的核酸に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴヌクレオチドプローブを使用するポリメラーゼ連鎖反応による増幅処理を施し、ここで前記オリゴヌクレオチドプローブを担持した粒子が存在しているか又はその後添加して、増幅を可能にするに十分な量の前記プライマーを与える、請求の範囲第12項に記載の方法。
- 17 一重鎖核酸の配列決定方法であって、  
 (a) 配列決定するオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を担持した超常磁性单分散粒子を製造する工程、  
 (b) (i) 粒子を4つのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、各アリコート毎に異なる1つのジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び必要であればプライマーを添加する工程であって、プライマーハスヌクレオシドハスジデオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程又は、(ii) 全粒子に、ポリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスフェート、それぞれ異なったラベルを有する4つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフェート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、  
 行うことによって、それぞれ異なった鎖長と特定のジデオキシ塩基をともなった末端を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、  
 (c) ラベル付けされたDNA鎖を濾過させ、大きさ毎にそれらを分別する工程

- 程、及び  
 (d) 配列を決定する工程、  
 を含む方法。
- 18 標的核酸を単離及び/又は処理するためのキットであって、  
 (a) 請求の範囲第1項に記載の磁性粒子、及び以下に記載の：  
 (b) ポリメラーゼ  
 (c) 逆転弓酵素  
 (d) 脱酸エンドヌクレアーゼ  
 (e) 適当な緩衝液  
 (g) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを担持しているか又は担持するように適合させていてもよいもの  
 (h) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくらかがラベルを担持しているか又は担持するように適合させていてもよいもの  
 (i) オリゴヌクレオチドであって、ラベルを担持しているか又は担持するよう適合されているもの  
 (j) 簡便なPCR<sup>®</sup>-プライマー及び/又はF<sup>+</sup>-プライマーであって、ラベル付けさせていてもよいもの  
 のうちの少なくとも1を含む、キット。
- 19 請求の範囲第1項に記載の磁性粒子の製造方法であって、既存により追加の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面の官能基又は分子に共有又は組合結合させる、方法。
- 20 オリゴヌクレオチドを、  
 (a) オリゴヌクレオチド上のビオチンと粒子上のアビシン又はストレプトアビシンとの反応  
 (b) オリゴヌクレオチド上の5'-アミノ基と粒子上のカルボキシル又はトリキシ基との反応  
 (c) ヒドロキシル又は保護されたヒドロキシル基を有する粒子上のオリゴヌクレオチドの直接化学的合成  
 によって結合させる、請求の範囲第19項に記載の方法。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は新規な核酸プローブ及びそれを濡製し使用するための方法及びキットに関する。

核酸の生化学的操作においては、特定の核酸物質を複合混合物から単離しこれに非常に広範なプロセスを施すことが望ましいことが多い。標的(target)核酸の十分に長い配列が知られている場合、その配列に選択的にハイブリッド化し、その核酸の同定及び/又は単離に使用することができるオリゴヌクレオチドを設計することが特に有用であることが判明した。特に、そのようなプローブを不動化して、標的核酸を含む複合混合物との接触の際に標的核酸が選択的に不動化され、従って分離されるようになることが提案されている。

以前より、オリゴヌクレオチドを磁性粒子に結合させることが提案されている【例えば、アドバンスト・マグネットィックス(Advanced Magnetics)の米国特許第4572040号、アモコ・コーポレーション(Amoco Corporation)の欧州特許第255244号】。しかしながら、これらは決して単分散ではなく、通常、適当な平均粒度まで微粉砕され、その後、ある範囲のオリゴヌクレオチドを含む問題の生体分子への結合を可能にする官能基をもたらす物理的破壊された磁性粒子から成っていた。さらに、このような磁性粒子は特に自動化された反応系では信頼性がなく、実用上好ましくないことが証明されている。特に、微粉砕によって製造された微細磁性粒子はしばしば磁気的凝聚に不適切に応じ、かなりの割合が結合した生体分子とともにサスペンション中に残留し、理論量よりも少ない生体分子の単離しか行わないことが判明している。本発明は、单分散超常磁性(monodisperse superparamagnetic)粒子が以前に提案された磁性粒子よりも大幅に信頼性が高いということの発見に基づくものである。

本発明に従って、本発明者は、複数のオリゴヌクレオチドの分子を担持した单分散超常磁性粒子を提供する。

本発明の粒子は、標的一重鎖核酸に対するハイブリッド形成用のプローブとして使用でき、また前記オリゴヌクレオチドの地基配列決定を可能にすることにも利用できる。

オリゴヌクレオチドは一重鎖DNAであるのが好ましいが、それはこれが

RNAと一重鎖DNAの両方に対してハイブリッド形成し、かつRNAよりもかなり安定だからである。このようなDNAには、オリゴ-dT(これは自生(生来の)真核生物のmRNA上に普遍的に存在するポリ(A)「テール(tail)」とハイブリッド形成する)及び標的RNA及び+DNA分子中の特定の配列とハイブリッド形成する特異的DNA配列が含まれ、又は塩基配列決定用のDNA分子でもよい。各プローブは、オリゴ-dT又は特異的DNA配列でよい一重鎖DNA配列が磁性粒子に直接結合したものから成ることができ、DNAの二重鎖部分を介して磁性粒子に結合していてもよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、合成及び自生のあらゆる鎖長のDNA及びRNA配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの鎖長は12乃至200塩基(base)が好ましく、15乃至50塩基がさらに好ましい。オリゴ(dT)配列と、特定の用途では、創設酵素部位(単鎖又は複数)とを含むプローブオリゴヌクレオチドは、市販のDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ・インク(Applied Biosystems, Inc.) (CA 94404、フォースターシティー・リンク・センタードライプ、850-T)製の各装置、のいずれかを利用することによって最も好適に製造することができる。

本発明によるプローブは、一般に、標的核酸の单離とその後の化学的及び/又は生化学的技術による操作において使用される。

磁性粒子を使用することによる幾つかの利点は明らかに确立している。磁性粒子を、標的核酸を含む混合物、例えば細胞エキス、に添加し、攪拌し、そして磁気的に容器の一方の側に引き寄せ。液体はその後不要な成分とともに除去でき、そして、結合したRNAを有する磁性粒子は洗浄溶媒中に再分散できる。洗浄工程はやっさげに数回繰り返すことができる。標的核酸を得る全工程を15分以内で行うことができる。

別の利点は、磁性粒子を使用して行われるハイブリッド形成又はその他のいかなるプロセスも、間隔を置いて粒子を磁気的に凝集させ、粒子上の物質又は上述液中の物質に結び付いたラベル(label)を分析することによって、逐続的にモニターすることができるということである。

## 特表平4-501959

磁気的凝集を使用することによる粒子の分散は、核膜又は蛋白質を劣化させる可能性のある剪断力を生じる過剰分散のような従来的な分散技術よりもはるかに優やかである。

磁性粒子は単分散でありかつ経常磁性であり、これらの特性は、粒子が含まれる反応の速度論に大きく寄与する。粒子に拘束されたプローブが種々の反応において溶液中で実質的にまるで遊離状態であるかのように速く反応することは、本発明の最もべき特徴である。従って、例えば、磁性粒子を使用する細胞治療法からinRNAの全半減を約15分以内に行なうことができるが、これに対しアフィニティーカラム(affinity column)を使用すると2時間である。単分散粒子、即ち、ほぼ同じサイズを有する粒子、を使用することによって、反応選択性及びその他のパラメーターは特に均一である。超常磁性粒子(即ち、永久磁性を維持するのに必要な磁区(domain)の大きさよりも小さい強磁性体のサブ粒子を含む粒子)を使用することによって、反応中の粒子の凝聚(aggregation or clumping)を防ぐことができ、従って、これもまた均一かつ高い反応速度を確実にする。従って、粒子は磁場をかけることによって表面上に均一な速度で容易に凝聚させることができるが、例えば物理的搅拌によって、その後の処理に容易に再分散させることができる。挙動の均一化及び反応の選択性は特に自動化への道をもたらし、このことは、工業的製造及び/又は反復的プロセスにおいて必要な多くの操作の必須要件である。最小限の人間の介入しかともなわない適切な機械によって、反応及び分散が完全な信頼性をもって行えるということは最も重要な事である。

本発明において使用するに好ましい磁性粒子は、歐州特許第83901406.5号【シントフ(Sintef】に從て製造される單分散超常磁性粒子であり、この引例の開示は本明細書中に含まれる。これらの粒子中には、鉄が非常に均一に分布しており、磁場に対する非常に均一な応答をもたらし、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、再現性のある方法、特にオートメーション、を設計する際に最適である。さらに、再現性のある量の鉄が各粒子に組み込まれているので、これを、以下で説明する細孔の粒子の比重を可能にする比較的低い濃度に調節することができる。従来の、規則性の劣った生成物においては、

小粒子は、磁場がかけられた時にブラウン力(Brownian force)を打ち消すには少なすぎる鉄しか含んでいないか、或いはその物質の比貢はより大きな粒子の望ましくない沈降を生じさせる。幾つかの自動化された装置は、粒子を反応領域内に保持し、一方溶液は流れていかせるのに、磁場を使用している。この様な装置で使用するためには、磁性粒子の均一な磁性的及び粘彈性的性質は必須のものである。

本明細書中ににおいて使用される「単分散」という用語は、56本滴の直径標準偏差を有するサイズ分散を意味するものである。

1.1乃至1.8の比重を有する粒子を使用するのが好ましく、1.2乃至1.5の比重が特に好ましい。本発明に従って使用される単分散粒子において、比重はここでも特に均一であり、均一で予測可能な速度論的挙動をもたらす。

単分散粒子は、少なくとも1ミクロン、好ましくは少なくとも2ミクロンの直徑の球状粒子であるのが適切であり、好ましくは10ミクロン以下、より好ましくは6ミクロン以下であり、例えば約8ミクロンの直徑であるのが好ましい。粒子が小さくなればなるほど沈降はゆっくりになり、沈降時間が反応時間に比べて長くなることもあり、従って物理的搅拌の必要性を省ける。しかしながら、従来技術で使用されているような、ずっと小さい直徑の微細粒子を含む平均直徑が0.1乃至1ミクロンの粒子は、磁化への応答において信頼性があるようには行動しない。

プローブの粒子への結合は、直接的化學結合並びにストレプトアビシン(streptavidin)/ビオチン(biotin)複合体などによる親和力結合でよい。

プローブの結合用に、磁性粒子は、ヒドロキシルカルボキシル、アルデヒド、又はアミノ基を有してもよい。一般に、これらは、被覆されていない単分散超常磁性粒子を処理して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの表面被覆を施すことによって設けられ、ポリマーの例は、ヒドロキシル基を与えるためのポリグリコールをともなうポリウレタン、ヒドロキシル基を与えるためのセルロース誘導体、カルボキシル基を与えるためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を与えるためのアミノアルキル化ポリマーなどである。米国特許第4654267号は、このような表面被覆をたく

さん紹介している。

本発明において使用するに好ましい被覆された粒子は、米国特許第4382173号、第4459378号、及び第4654267号に従う粒子の改善法によって製造でき、これらの引例の開示は本明細書中に含まれる。従って、例えば、ステレンジビニルベンゼンから製造され、3.15ミクロンの直徑を有するマクロ網状(macro-reticular)多孔質高分子粒子は、N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理され細孔の表面に-KO<sub>2</sub>基が導入された。その後、粒子は、Fe<sup>3+</sup>の水溶液中に分散された。Fe<sup>3+</sup>は-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>基によって酸化され、これは細孔の内部に不溶性の鉄オキシドロキシ化合物を析出させる。加熱後、鉄は、磁性化鉄の微粒鉄粒子として、細孔粒子全体にわたって存在する。KO<sub>2</sub>基はFe<sup>3+</sup>との反応によって和解して還元される。

細孔を擴たし表面に所載の官能基を導入するためには、別のモノマーを細孔半径及び表面で重合させる。好ましい粗粒の粒子の場合、表面は、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH結合を通してポリマー表面に結合している-OH基を有する。その他の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって導かれた-COOH基を有する。

従って、例えば、粒子中に初めてから存在している-NH<sub>2</sub>基を、米国特許第4654267号に記載されているようにジエボキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて末端ビニル基を残さない。メタクリル酸との複数次連合は、以下で詳述するE452粒子のよう、末端カルボキシル基を有するポリマー被覆を生じる。同様に、E240、R442、及びR469ビーズのようなジエボキシドとの反応の上記生成物をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方E45C及びL255ビーズのように、アミノグリセロールのようなヒドロキシルアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ(Dynabeads)M450(直徑4.5ミクロン)(これはノルウェー、オスロのダイナル社から得られる)は、单量体エボキシドで被覆されており、エボキシ基とヒドロキシ基の混合物をもたらす。しかしながら、水との接触はエボキシ基をヒドロキシ基に転換する。

ダイナビーズM-280(直徑2.8ミクロン)は、p-トルエンスルホニルクロリドとの反応によってトリロキシ基(tosyloxy group)に転換されているヒドロキ

ル基を有するポリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された被覆を用することによって、DNA及び/又はRNAの非特異的結合が非常に低くなり、特に、カルボキシル化ビーズの場合にそうであることを本発明者らは発見した。

ハイブリッド形成したRNAを次にcDNA合成に使用する場合、プローブとR<sub>1</sub>リンカ-はカルボキシル基を介して粗粒粒子に結合しているのが好ましく、このDNAは最初にS'-末端アミノ基が供給され、これはカルボジイミドカップリング剤を使用してカルボキシルとアミド結合を形成させることができ。DNAのS'-結合は、S'-アミノ-DNAと反応するようにCNBrで活性化されたヒドロキシル化磁性粒子を使用して行なうことができる。

オリゴヌクレオチド-DNAのS'-結合もまた化学的合成によって行なうことができる。ここでもまた単分散粒子の非常に均一な性質は、ジーン・アセンブラー(Gene Assembler)【ファルマシア(Pharmacia)A/S製】のような自動化された合成装置中の合成に特に適する均一な反応速度をもたらす。磁性粒子は、初めにヒドロキシル基又は保護されたヒドロキシル基を供給されることを必要とする。ダイナルA/S製のダイナビーズM-280はこの目的によく適合する。しかしながら、必要な場合には、カルボキシルのような他の表面官能基を使用してヒドロキシル基を有するリンカ-又はS'-結合ヌクレオチドを結合させることができる。

S'-結合は、S'-アミノ-オリゴヌクレオチドのトシリ活性化磁性粒子へのカップリングによって行なうことができる。トシリ活性化磁性粒子は、ダイナルA/S製のダイナビーズM-280のようなヒドロキシル化磁性粒子をトシリ化することによって製造できる。トシリ基の置換は、磁性粒子に直接結合したS'-アミノ基を残す。

しかしながら、プローブがRNAの単離にのみ使用される場合には、プローブのS'-末端を粗粒粒子に結合してもよく、これは、DNAのS'-ホスフェート基と粒子上のアミノ基の間にホスホルアミド結合を形成させることによって簡便に行なうことができる。

ビオチンラベルされたヌクレオチドは市販されているので、DNA断片の

3'-末端はDNAポリメラーゼを使用して容易にラベル付けでき、これらは、例えばヒドロキシル基を介して磁性粒子に結合しているアビシン又はストレプトアビシンに簡便に結合できる。ビオチンラベルは、1つ以上のε-アミノカブロン酸部分のよう、スペーサーチーム(spacer arm)によって、タクレオチドに結合させて立体障害を最小化できる。従って、例えば、二重鎖プラスミドを制限部位で切断し、各鎖の3'末端にビオチンを与えるように、その末端にビオチニル化されたタクレオチドを付けることができる。線状化された(linéarised)プラスミドが、その後、別のRNA部位で切断される場合、二重鎖DNAの部分は切離され、ストレプトアビシン被覆されたビーズに結合する可能性がある。ビオチニル化されていない鎖を除去するとビーズに結合した、ビオチンの結合したタクレオチドが残る。

一般に、粒子を官能化し、その後プローブを結合させ、各磁性粒子は10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>のプローブを有するのが有利である(1~300 pmol/ag)。磁性粒子の均一なサイズは、プローブが粒子と反応する標準的なプローブ密度を確実にする点で有利である。均一なプローブ密度は、全てのプローブが、それらが使用される様々な手順において実質的に同じようにふるまうことを確実にする点で重要である。

酵素活性が、粒子の表面に非常に近いところ、例えば7ベース(bases)以内、で起こるようであることは、本発明の點滴な特徴である。従って、もしRNA部位が接近するようなリンクー配列中には存在し、かつプローブがその後プライマーとして使用される場合、ss c DNAと従ってds c DNAを、DNAポリメラーゼによってRNA部位を越えて粒子表面に向かって合成でき、従って、それを適当なエンドヌクレアーゼによって容易に切断できることが判明した。本発明のカルボキシル化された粒子の場合、粒子のミクロ表面が非常に不規則であり、その表面近くでのハイブリッド形成と酵素活性に対する立体障害を経験できるような非常に大きな表面積が存在していることが判明した。一方、このようなカルボキシル化された粒子への非特異的結合は増加しない。

本発明による、オリゴタクレオチドを担持している経常磁性単分散粒子は、広範囲の方法において使用できる。これらのいくつかを以下に記載する。

を含む方法が提供される。

望ましくないRNAのランダムなハイブリッド形成を防ぎ、ハイブリッド化溶液の残りの成分の除去を完全にするために、磁性粒子は最初の磁気的分離の後少なくとも1回洗浄するのが好ましい。ランダムな部分相間によって結合されたRNAを除去するために、この洗浄はストリンジメント(stringent)条件下で、温度を上昇させるか又はハイブリッド化中に使用するよりも低い温度で、例えは0.5Mの塩化ナトリウム又は同等の溶液(equivalent solution)、を使用することによって行ってもよい。

ストリンジエンシー(stringency)は通常プローブの長さとG:C含有率によって計算される。プローブオリゴタクレオチドと標的mRNAの間の相同性(homology)が不完全である場合、洗浄は比較的低ストリンジメント条件下で行うべきである。一般に、洗浄は、2重鎖(dsDNA)の融点(T<sub>m</sub>)より12°C低い温度で行われる。大体のT<sub>m</sub>は、上記のマニアチスの文献の888~889頁からの以下の関係に従って簡便に計算できる。

$$(a) T_m = 69.3 + 0.41 \times (G - C)\% - 850/L$$

Lはタクレオチド中のプローブの平均長さに等しい。

(b) この2重鎖DNAのT<sub>m</sub>は、不一致の塩基対の数が1%増加することによって下がる。

$$(c) (T_m)_u - (T_m)_v = 18.5 \log_{10} u/v$$

ここで、u及びvは2つの溶液のイオン強度である。

小さいオリゴタクレオチドに対しては、この融点は以下のように他の単位で近似できる。

$$T_m = 2 \times (A + T \text{ 独基の数}) + 4 \times (G + C \text{ 独基の数})$$

ハイブリッド化反応は、1M塩化ナトリウム溶液又は本技術分野で公知の同等の溶液中で行うのが好ましい。【ヌクレオティック・アシッド・ハイブリダイゼイション(Nucleic Acid Hybridization)、バー・ディー・ヘイムズ(B D Haines)及びエス・ジー・ヒギンズ(S J Higgins)、アイアールエル・プレス(IKL Press)、1985、を参照のこと】。

プローブからのmRNAの除去は、適当な緩衝液、例えは、1 mM EDTA、中

### 1. mRNAを含む混合物からのmRNAの単離

真核細胞エキスからmRNAを得る従来的方法は、ナイー・マニアチス(N. Maniatis)らによって記載されている【モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): ラボラトリー・マニュアル(Laboratory manual), 187~188ページ】。簡単に述べると、オリゴ(dT)を、親和性マトリックス、典型的にはカラム、を作るために使用されるアガロースビーズ又はセルロースに結合させる。細胞エキスをカラムに通し、細胞エキスがカラムを通過するにつれて、mRNAのオリゴ(dT)が結合する。カラムを洗浄し、その後mRNAはカラムから溶出される。しかしながら、通常少なくとも2時間というそれに必要な時間のために、この方法は選択からはほど遠い。

RNAの全ての種は、細胞造形物中に存在するリボソームによって急速に加水分解する傾向にあるので、細胞の溶解できるだけ速やかに単離し、cDNAに逆転写することが重要である。そうしないと、mRNAのかなりの割合が劣化し、完全な遺伝子のDNAに対応する全長のmRNAを得るのが困難になる。細胞エキスからのRNAを分離する従来的方法を使用すると、mRNAがカラム上にいる間に多くの時間が費やされ、望ましくない劣化をもたらす。さらに、アガロース又はセルロースビーズのカラムはその他の細胞成分によって汚染され、或いはさらには詰まり、容易に再使用できない。

本発明の目的は、mRNAを得て増量する迅速な方法を提供することである。

本発明の別の特徴によれば、RNAをその他の成分とともに含有する液体からRNAを単離する方法であって、

- (a) 結合したオリゴタクレオチドプローブを有する複数の超常磁性単分散粒子を前記液体に添加し、それによってRNAを前記プローブに対しハイブリッド形成させて前記粒子に結合させる工程、
- (b) 前記粒子を固体表面上に磁気的に凝集させる工程、及び
- (c) 液体とその他の成分を離集した粒子から分離する工程、

において65°Cで熱処理することによって行うことができる。

本発明の方法は、特定のmRNAソラクション又はさらに特定のmRNA分子の分離の前の予備精製工程としてのように、脂溶性解液からの全てのmRNA物質の分離に適用することができる。この目的のために、プローブはオリゴ-dT、周も、例えは12乃至20塩基(base)、好ましくは15乃至50塩基のような、比較的短いオリゴシチミン単位の類、であるのが好ましい。このような類は、オリゴシチミンの逐次的重合成いは、より短い類に対しては、自動化されたDNA合成又は従来の重合によって、容易にかつ安価に製造することができる。

オリゴ-dTプローブは共有又は親和結合によって粒子に直接的に結合できる。この場合、ハイブリッド化されたRNAはその後加熱によって溶液中に遊離させ、所要の緩衝液中所要の濃度の特製mRNAの混合物を与える。

この実験装置の別の利点は、もしそれが5'-末端を介して粒子に結合する場合、DNAプローブの3'-末端はまた逆転写用のプライマーとして作用して一直線相補的(complementary)DNA(ss c DNA)を形成することが可能であり、ss c DNAはその後、所望により、本願出願人の英国特許出願第8827156.0号及び第8827159.8号に対応する本願と同日付けの国際出願(その内容は参考として本願開示書中に読み入れられる)に従って、単離したmRNAに相補的な二重鎖(cDNA)を製造するのに使用できる。1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を有するリンクーを介してのDNAプローブの5'-末端の結合によって、このプローブ、合成されたss c DNAは、制限酵素的切断によって粒子から遊離させることができ、粒子は磁気的に分離される。

しかしながら、本発明の別の実施形態によれば、プローブは標的mRNA分子に対して特異的である。

磁性粒子にカップリングされた特異的DNAプローブの使用は、プローブとハイブリッド形成する共通の配列を有するmRNA分子の族(family)を単離する際に特に価値がある。従って、例えは、免疫グロブリンをコードするmRNAは、直鎖と転写の定常領域からのDNAプローブを使用して隔離す

る相対ユキスから単離できる。遺伝的に伝達される疾患の研究において、遺伝子の保存された配列(conserved sequence)に対応するプローブを使用して一連の改変された遺伝子から転写されたmRNAを単離することができる。

## 2. 一重鎖DNAの単離

本発明による磁性オリゴタクシオチドは、mRNAの場合と質的に同じ方法で、cDNAを単離するのに使用できる。細胞溶解放のように、DNAがサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、離分離工程が初めて必要である。これについては、後述のポリメラーゼ族反応での説明で説明する。

ボリdTプローブを担持する本発明の磁性粒子は、特定の標的核酸配列(specific target nucleic acid sequence)の分離に有利に使用することができる。標的核酸の公知の配列に相補的なDNA配列及びさらに、例えば、10-25ntユニットのボリdTを含むプローブを合成できる。このプローブは標的核酸とハイブリッド形成し、そしてラベル付けされたさらなるプローブはその核酸の別の配列とハイブリッド形成する。その後、この三重複合体を捕獲するためにボリdTを担持している磁性粒子を使用でき、捕獲条件は、ボリdTとボリdTの間の水素結合のみが生じるようなものである。ボリdTとボリdTの間の比較的弱い結合は、例えば、加熱又はグアニジンチオシアネート緩衝剤による洗浄によって、容易に可逆的になる。従って、ハイブリッド化溶液からの磁性粒子の除去及び洗浄の後、三重複合体を粒子から放出させることができ、さらに選択的に精製するために、1回以上のサイクルの捕獲処理を行うことができる。この技術は、過剰のラベルでラベル付けされた標的核酸の汚染、從来的分析システムにおける「ノイズ(noise)」の共通の敵、を防ぐ点で特に有効である。

## 3. 一個組のRNA又はDNAの塩基配列決定法

DNAの塩基配列決定には2つの主要な方法、即ち、Maxam-Gilbert法とSangerジオキシ法がある。Maxam-Gilbert法は、1本の組の5'末端でラベル付けされているDNAを用いて出発する。ラベル付けされたDNAは、その後、4つのヌクレオチドの1つで優先的に切断される。条件は、平均して

1本当たり1つの切断が起こるように選択される。与えられた塩基での切断用の反応混合物中において、各々の切断された鎖は、5'末端からその塩基の位置の1つまで伸びる放射性断片を生成し、そのような断片は塩基の全ての位置に対して生じる。これらの断片は、例えば、PAGEによって分離され、ゲルからオートラジオグラムが作られる。切断された各塩基までの鎖長を測定することによって、全體の配列を決定できる。Maxam-Gilbert法は250塩基以上の配列を決定するのに使用できる。

DNA塩基配列決定用のSangerジオキシ法は、酵素的複数の制御された妨害に依存する。DNAポリメラーゼは一重鎖DNAの待機配列のコピーに使用される。この合成は、相補的断片によってプライムされる(prised)。4種のデオキシリボヌクレオシドトリホスファートに加えて、インキュベーション混合物は、それらのうちの1つの2',3'-ジデオキシ類縁体(analogue)を含む。このジデオキシ類縁体又はデオキシリボヌクレオシドトリホスファートのうちのいずれか1つがラベル付けされる。この類縁体は次のホスホジエステル結合を形成するに必要な3'-ヒドロキシ末端を欠いているので、この類縁体の組み込みは新しい鎖がさらに成長するのを妨害する。従って、ジデオキシ類縁体が3'末端にある様々な長さの断片が形成される。このような連鎖形成-停止(chained-terminated)断片群の4つの組(各々のジデオキシ類縁体に対して1つずつ)をゲル上で電気泳動させて、4つのレーンのオートラジオグラムからDNAの塩基配列を読み。最近、ジデオキシ法の式法が考案され、これはオリゴヌクレオチドプライマーへの、蛍光性標識物(4つの連鎖停止反応混合物の各々に異なる色のもの)の結合を含む。これらの混合物はまとめて、一緒に電気泳動させる。それらが検出器を通過する時、それらの蛍光によって、DNAの分離したバンドが検出される。この方法では500塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約250塩基のようなより短い配列が好みである。

DNAのかなり長い配列は、これらの方針によって塩基配列の決定をする前に、より小さい断片(250-550塩基)に切断しなければならない。通常、配列データを正確に集めるためには、部分的に並びり合う断片が必要である。

## 部分的に並びり合う断片の形成はDNA配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される塩基配列決定法の1つは、DNA配列をM13ファージ中に(これは一重鎖DNAを与える)にクローニングする。配列が500塩基対よりも長い場合、通常の方針は、初めの部分の塩基配列を決定し、このようにして得られた情報を使用して、次の500塩基部分用のプライマーを合成し、そしてこの手順をDNA鎖全体の塩基配列が決定されるまで繰り返す。しかしながら、テンプレートDNAを含む全てのDNA鎖がゲル上に投入されなければならないので、各回毎にクローニングM13ファージの新しいサンプルを使用する必要がある。核酸の大きな片のサブ断片を形成する必要がない、核酸の塩基配列決定法に対する要望がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要望もある。

本発明のさらに別の面によれば、一重鎖核酸の配列決定方法であって、

- (a) 配列決定すべきオリゴタクシオチド(DNA又はRNA)を担持する超常磁性单分散粒子を製造する工程、
- (b) (i) 粒子を4つのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ボリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスファート及び1つのジデオキシヌクレオシドトリホスファート、及び必要であればプライマーを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスファートは各アリコート毎に異なり、プライマー又はヌクレオシド又はジデオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程又は、
- (ii) 全粒子に、ボリメラーゼ、混合ヌクレオシドトリホスファート、それぞれ異なるラベルを有する4つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスファート、及び、必要であればプライマー、を添加する工程、を行うことによって、それぞれ異なる鎖長と待機のジデオキシ塩基をともなった末端を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、
- (c) ラベル付けされたDNA鎖を遊離させ、大きさ毎にそれらを分別する工程、及び

## (c) 配列を決定する工程、 を含む方法が提供される。

配列決定される一重鎖核酸はオリゴヌクレオチドであること、及び工程(a)が本発明による結合されたオリゴタクシオチドを有する磁性粒子の形成を含んでいることに注目すべきである。配列決定される一重鎖核酸がDNAである場合は、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼでよく、RNAである場合は、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼか又は逆転写酵素であることは認められるであろう。

サイズ別分時に断片の同定を確実にするために、プライマー配列は、それに結合したラベルを有してもよく、或いはヌクレオシドトリホスファート又はジデオキシ塩基又は、例えば、放射性リンでラベル付けてもよい。磁性粒子に結合したテンプレート核酸とcDNA断片を配列決定用緩衝剤中に溶解させることによって、過剰のラベルを系から除去できることは、本発明の配列決定法の特徴の1つである。従来的配列決定法においては、過剰なラベルが配列決定ゲルからの像(image)を妨害していた。

本発明による特に有効な方法の1つは、初めに、配列決定するDNAをクローニングベクター中にクローニングして配列決定用のDNAを十分な量準備する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適当な部位で切断され、簡便にベクターの結合部分(これらは既に配列決定されている)を残して磁性粒子への結合に適する点を提供する。

二重鎖DNA配列が3'-ビオチニル化配列を介して粒子に結合している場合、それを変性させて、配列決定するDNAを含み、隣接プライマー部位を介して磁性粒子に結合している一重鎖を残すことができる。

上記のものに対して相補的なプライマーは、例えば、放射性ヌクレオチド及びボリメラーゼプライマー部分を加えアニーリングすることによって上記のものにアニーリングし、ラベル付けすることができる。その後、上で既述を述べたような、サイズ分別を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、

## 特表平4-501959

約250の塩基に対してのみ統合され、正確なサイズ分別を可能にする。これは、ジデオキシヌクレオチドのノーマルヌクレオチドに対する比率为調節することによって達成される。合成されたcDNA断片は、粒子上のDNAに寄与すること無く変性によって除去できる。その後、配列情報は、配列決定されるべき次の1-連の塩基用の短鎖プライマーを設計するために利用できる。このようにして、非常に長いDNA鎖（例えば、2000塩基）が、部分的に、従来の方法に見られる重複の問題に遭遇することなく、塩基配列決定ができる。

クローニングベクターに組み入れられているプライマー配列は、使用には、従来のM13塩基配列決定において使用されている、いわゆる、「ユニバーサルプライマー(universal primer)」である。*lac Z'* 遺伝子を有する全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、5'-CTAAACCCAGCTGAT'の配列を有している。

本発明の塩基配列決定方法は種々の形態を取ることができる。

- A. 配列決定されるDNA鎖は、3'-ビオチニル化され、ストレプトアビシンを有する磁性粒子に結合してもよい。所望により、二重鎖DNAをこのようにして結合させ、その後、変性して配列決定に必要な一重鎖を與えてもよい。これは、上液から離離されるべき分離した鎖が不動化された鎖で汚染されないようにでき、このもう一つの鎖は初期に配列決定して配列確認の確実性を与えることができることは注目すべきである。プライマーはDNAの3'領域にハイブリッド形成させ、上述のデオキシ及びジデオキシ塩基が統計で約500塩基まで配列決定し、次の部分を配列決定するために上述したようにさらにプライマーが必要とされる。
- B. 配列決定されるべきDNA鎖は、磁性粒子に担持されているリンクーにハイブリッド形成でき、このリンクーは一重鎖DNAのループの形態であり、ここで、3'末端が3'-末端に近い領域でハイブリッド形成し、DNA鎖の3'末端領域に対応する粘着性(sticky)末端を残す。このようなループは、アミノ又はビオチン基を介して磁性粒子に結合することができ、これらの基は粒子に担持されたカルボキシル又はストレプトアビシン基とそれ

ぞれ反応することができる。DNA鎖は、3'-末端で脱ホスホリル化され、その後、ループの5'-末端に連結して共有結合を有してもよい。ループによって与えられたものに對応する粘着性末端を有する二重鎖DNAは、このようにして結合することができ、2つめの鎖はその後変性によって除去でき、500塩基までの第1の部分を配列決定するためのプライマーとしてのループの3'-末端を残すことができる。

C. 磁性粒子は、DNAにある部分に対しハイブリッド形成するプローブを担持することができ、このプローブは第1の部分の正規決定をするためのプライマーとして役立つ。プローブに対してハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに対し3'-であるのが好ましい。これは、後者のDNAが追加の末端DNA配列とともにベクターから切断される場合、普通に起こり得ることである。核酸がmRNAの場合、プローブは、野生高級mRNAのポリAテール(tail)に対しハイブリッド形成する5'-結合オリゴ-dT配列でよい。或いは、例えば、mRNA中のある配列に対しハイブリッド形成する特異的DNA配列でもよい。

配列決定法がプライマーにラベルを担持することを要求する場合、プライマーとしても機能するプローブは、合成されたDNA鎖をラベルとともに粒子から切り離すように、適当なRER配列を有していないなければならない。この条件は方法2)及び3)の両方に適用される。しかしながら、プローブに共有結合せず從って合成されたDNA鎖とともに容易に分離する、分離ラベル化プライマーを単に使用することもできる。

### 4. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による標的核酸の増幅

標的DNA分子は、細胞溶解放又はその他の原料中に極めて少量でしか存在しないことが多く、配列決定の前にそのようなDNAを選択的に増幅(amplify)するためには、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用してもよい。標的DNAを増幅するためにはクローニング工程を使用するよりもむしろPCR法が使用される。PCR技術においては、標的DNAの公知の配列に特異的な一对の混合プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが

標的DNAテンプレートの全長まで伸びるDNA配列を生成するように、一方はコーディング鎖の5'末端又はその付近でハイブリッド形成し、他方は非コーディング鎖の5'末端又はその付近でハイブリッド形成する。このようにして製造されたDNAがその後、典型的には約90°Cでの浴融による、鎖分離処理にさらされる場合、新たに形成された一重鎖DNA配列に混合物中に存在する過剰のプライマーに対しハイブリッド形成し、通常アニーリングに適する範囲まで温度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらにDNA鎖が合成されるが、今度は2つのプライマーの末端間しか伸びない。ポリメラーゼは、鎖分離工程で使用される高温中で生き延びることができるのが好ましく、過熱の耐熱性ポリメラーゼ、すなわち、*Taq I* が最近利用できるようになった。過剰の2つのプライマー及びDNA合成に必要な過剰のヌクレオチドが混合体で維持される場合、個々の鎖が合成され、分離され、プライマーにアニールされ、新しい鎖が合成される反復循環プロセスを、年に上記の各工程に対する最適温度の間で温度を上下させることによって行うことができる。この方法においては、オリジナル標的DNAの増幅が指数関数的であり、温度の数百万倍の増加が比較的短い時間で行うことができる事が判明した。

しかしながら、プライマーのその他のDNAへのある程度の非特異的結合と、それにより標的DNAに加えてその他のDNAが増殖されることによって、この方法は必ずしも十分に選択性ではない。プライマーの非特異的結合による、このサンプルDNAのランダムな部分の増幅は、標的DNAからのシグナルに比較してバックグラウンドのノイズを増加させる。多くの場合、このバックグラウンドノイズのレベルの増加は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子クローニングに適用して、このプライマーの非特異的結合の問題が、第1の対のプライマー中に入れ子になっている第2の対のプライマーを使用することによって解決できると提案されている。

4つの別個のプライミング事象が起こることを要求することによって非特異的結合の大略な低減が達成できる [ムリス ケー・ビー(Bullis, K. B.)、ケー・ファローナ エフ・エー(E. Falocca, F. A.)、メソッズ・イン・エン

ゲイモロジー(Methods in Enzymology)(1987)155 355~350頁、及びライシュニク エル・エー(Wrischnik, L.A.)らのNuc. Acids Res. (1987)15 529~542頁、を参照)。エンゲルケ ディー・アル(Engelke, D.R.)らは、オリジナルのプライマーの一方に入れ子になっている、ただ1つの新しいプライマーが、標的DNAのより大きくかつより一致した増幅をもたらすことができる事を示唆している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 544~545頁)。

本発明者は、本発明の結合したオリゴヌクレオチドを有する磁性粒子がPCR増幅法におけるプライマーの1つとして使用できることを見出した。この反応の速度論は溶液中で見られるものに近い。入れ子になった第2の対のプライマーが使用される場合、本発明の粒子は第2のPCR相において使用することのみが要求される。各々の場合、増幅された全てのDNAは磁性粒子上に不動化され、過剰の試薬を除去するために容易に洗浄できる。増幅されたDNAが溶液に除去できるように、粒子とオリゴヌクレオチドプローブ/プライマーの間に逆位はその他の可逆的結合を設けるのが好ましい。

ビオチニル化プローブ/プライマーを使用するPCRを行うこともでき、また増幅DNAを増幅するためにアビシン又はストレプトアビシンで被覆された本発明の磁性粒子を使用することもできる。

### 5. 標的DNAのラベル付けとその分析

英国特許出願第8827160.6号に対応する本願と同日付けの本願出願人による国際特許出願(その内容は参考として本明細書中に記載されている)には、標的核酸にラベル付けする方法であって、標的核酸の公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを担持した磁性粒子を標的核酸を含む混合物に添加し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び適当な核酸とともに使用して多数のラベル付けされたヌクレオチド塩基を組み入れたcDNAを合成する方法が記載されている。この方法は特に酵素で迅速であり、標的核酸を定量的又は定性的に分析するのに使用できる。

### 6. cDNAの合成

英同特許出願第8827158.0号及び第8827159.0号に対応する本願と同日付け

## 特表平4-501959

の本願出願人による国際特許出願（その内容は参考として本明細書中に組み入れられている）には、オリゴヌクレオチドプローブを担持した磁性粒子を標的核酸に対してハイブリッド化させ、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び適当なスクレオチド基質とともに使用して、cDNA鎖を合成することによる、cDNAの合成が記載されている。この方法は、個々のcDNA分子を合成するために、又は存在する特定種の核酸の全て、例えばRNA中の全て、に対応するcDNAを製造するために使用できる。

### 7. 本発明の磁性粒子を使用する方法のためのキット

本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

#### A. サンプル中の全てのcRNAを単離するためのキット

(a) オリゴ-dTを担持した本発明による磁性粒子、及び以下に記載の：

(b) ハイブリッド化緩衝液

(c) 洗浄用緩衝液

のうちの少なくとも1つを含む。

#### B. サンプルから特異的mRNA又はcDNAを単離するためのキット

(a) 特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による磁性粒子、及び以下に記載の：

(b) ハイブリッド化緩衝液

(c) 洗浄用緩衝液

のうちの少なくとも1つを含む。

#### C. DNA又はRNA基質配列決定用のキット

(a) オリゴ-dT又は特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による磁性粒子

(b) ポリメラーゼ、及び以下に記載の：

(c) 適当な緩衝液

(d) ジデオキシヌクレオチドddT、ddA、ddC、及びddG

(e) デオキシヌクレオチドdT、dA、dC、及びdG

(f) ジデオキシヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、又はオリゴヌクレ

オチドであって、各キャラベルを担持しているか又は担持するように適合されているもの

の少なくとも1つを含む。

#### D. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用キット

(a) 標的核酸の3'末端用の標準的特異的DNAプローブ／プライマーを担持した本発明による磁性粒子：

(b) 所望によりラベル付けされた標準的PCR 5'-プライマー；

(c) 热安定性ポリメラーゼ；及び以下に記載の

(d) 適当な緩衝液；及び

(e) 制限エンドヌクレアーゼ

の少なくとも1つを含む。

以下の実施例は説明のためのみに与えられている。

#### 実施例1 (a)

##### カルボキシミド(EDC)で仲介された5'-NH<sub>2</sub>プローブのカルボキシル粒子への結合

(a) プローブのカルボキシル粒子への結合に使用される反応は以下の通りである。チュウ(Chu)らによって記載された【Chu, B.C.F. 及びオーゲル(Orgel, L.E.), (1985)DNA 4, 327~331】、1工程反応法を使用してプローブの5'-末端に導入されたアミノ基は、複数のアミノ官能性と比較して、アルキルリシンカーネの末端第1アミノ基のより大きな官能性度をもたらす。次に、粒子上のカルボキシル基はこれらの第1アミノ基と優先的に反応することが予想された。

R452カルボキシル粒子1mg当たり、0.1Mイミダゾール緩衝液pH7、0.1M EDCの600μl中の100μg 5'-NH<sub>2</sub>改変プローブを添加した。反応混合物を室温で2時間保った。

(b) NH<sub>2</sub>改変プローブをアブライド・バイオシステム・シンセサイザー(Applied Biosystems Synthesizer)とアミノリンク(Aminolink)IIを使用して製造した。

カップリング反応は以下の通りであった。

R452カルボキシル粒子1mg当たり、0.1Mイミダゾール緩衝液pH7、0.1M EDCの100μl中の10μg 5'-NH<sub>2</sub>改変プローブを添加した。反応混合物をローラー・キサー【コールター(coulter)】上、室温で20時間保ち、その後0.1M NaCl(4X)を含むTE緩衝液中で洗浄した。

#### ハイブリッド形成(ハイブリダイゼーション)効率：

標的の量の結合したプローブを有するある範囲の粒子を相補的25merポリdTプローブを用いてハイブリッド形成実験において試験した。

粒子は、粒子1mg当たり1~250pmolの結合したプローブの範囲をカバーしていた。

25merポリdTオリゴヌクレオチドの量を増加させると、増加する量の結合したプローブとハイブリッド形成した。100pmolが、結合した250pmolを有する粒子に対してハイブリッド形成した。しかしながら、標的分子が1000bpの範囲にあった場合【対照mRNA、ソロメガ・コーポレーション(Promega Corporation)】、結合したプローブを100pmol有する粒子とより密度が高くカップリングした粒子とを比較してもハイブリッド形成効率に遜色はなかった。

#### 実施例2

##### カルボキシミド(EDC)で仲介された5'-ホスフェートープローブのアミノ粒子への結合

ゴーシュらによって記載された方法【ゴーシュ、ニス・エス(Gosh, S.S.)及びムッソ、ジー・エフ(Musso, G.F.), (1987) Nucl. Acids Res. 15, 5263~5372】によって、プローブをホスホルアミド結合を介して3種の異なるアミノ粒子に結合させた。これらの異なる粒子に結合したDNAの量は、1.4~11.3マイクログラム/mgであった。

ポリエチレンジリコールリシンカーネ(8原子)の末端にアミノ基を担持するR469粒子は、より短いリシンカーネ(3原子)上にアミノ基を担持するR442粒子のようにリシンカーネをもっと長くすると(原子の数=20)、粒子に結合するプローブの量の減少が観察される。これはおそらくリシンカーネの二次構造によるものであり、これが末端アミノ基をカップリングに利用できなくなるのであろう。

非特異的に結合したDNAの量は、おそらく単位表面面積当たりのアミノ基の数によって、粒子間で異なる(7~30%)。R469粒子は最も多くのプローブと共有結合する(11μg/mg)、これは最も低い非特異的結合しか水はない。

ホスホルアミド結合の酸不安定性【チュウ・ビー・シー・エフ(Chu, B.C.F.)、バール・ジー・エム(Bahl, G.M.)、及びオーゲル・エル・イー(Orgel, L.E.)、Nucl. Acids Res. 11, 6513~6529】は、酸加水分解によって末端結合の程度を測定するのに使用される。末端結合プローブの量は、異なる粒子間で20~65%まで変化し、また、R469粒子が65%の末端結合したプローブを有しており、好みしいようである。

本発明者は、pB6、室温で24時間の代わりに、pB7のイミダゾール緩衝液中50°Cで3時間反応を行うことによって、R469粒子に2倍のプローブ質量を結合させることができた。EDCのモル数を0.1Mから0.2Mまで増加させると、R469粒子上のプローブの量が20%減少した(データは示されていない)。

#### 一般的方法

600pmol(6μg)のオリゴA(86mer)を、1mlの0.1Mイミダゾール、pH7、0.1M EDCに溶解させ、5μgのアミノ粒子と混合し、50°Cで3時間保った。

#### 実施例3

##### 5'-NH<sub>2</sub>プローブのトシリ活性化粒子へのカップリング

アブライド・バイオシステム・DNAシンセサイザー-381AとアミノリンクIIを使用して、NH<sub>2</sub>基をオリゴヌクレオチドの5'末端に導入し、5'末端に第1NB<sub>3</sub>基を導入した。アミノリンクIIはアブライド・バイオシステム社から供給される。合成後これらのアミノ改変オリゴヌクレオチドは直接カップリング実験に使用された。

トシリ活性化T-280粒子は、オスコのダイナル(Dynal) ASから市販されている。

#### カップリング手順：

10μgのトシリ活性化粒子を、100μlの0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>中50μg RNase改変オリゴヌクレオチドと混合し、ローラー・キサー(コールター)上37°Cで20時間保ち、

その後0.1% NaCl(4%)を含むTE緩衝液中で洗浄した。

#### 実験例4

##### 直接合成

ダイナビーズB488粒子を使用した。これらは、直径が2.8ミクロンではなく3.15ミクロンであることを除いてM-280粒子と同じであり、M-280粒子と同様に表面に第1-OH基を含んでいる。

合成器【ファルマシア・ジーン・アセンブラー(Pharmacia Gene Assembler)】を使用して、DNAの5'末端を表面に結合させた。

3.15ミクロンの粒子に適合させるために極めて細かい変更が必要であった。アライド・バイオシステム社からの標準的小スケールカラム中、3.0ミクロンのカットオフを有するテフロンフィルターを設け、粒子を投入し、そしてカラムを組み立てた。

この粗抗体はジメチルトリチル(DMT<sub>3</sub>)基を含んでおらず、最初のサノクルの最初の工程でこのような化学汚染が避けられない場合装置が停止するので、開始手順に小さい変更を導入した。DMT<sub>3</sub>基が過剰するまで標準的ABI小スケルカラムを使用して合成を発出した。その後、ジーン・アセンブラーを手動で停止し、磁性粒子を含む改変カラムをジーン・アセンブラーに入れた。その後は装置の製造業者によって推奨されている標準的合成プログラムに従った。脱保護(deprotection)はファルマシアから推奨されたとおりに行なった。直接合成をオリゴ(dT)<sub>25</sub>及びカッパ絆縫(light chain)遺伝子のC領域からの以下の配列を調節するために使用した。

5'-TCATCTGGATGGGAAAGATGGATACAGTTGGTGCA-3'。

#### 実験例5

##### 材料と方法

##### 磁性粒子

ダイナビーズM-280ストレプトアビシン(ダイナルI.S. Box 158, S-0212 オスロ)を固相として使用した。これらは、2.8μmの直径を有しており、ストレプトアビシンと共有結合している単分散超常磁性ポリマー粒子である。これらは4.3%の表面密度を有している。

#### ビオチン結合能力

1 nmolの<sup>14</sup>C-ビオチン【アマーシャム(Amersham)】を含む100μl 6×SSPE(ホスフェートとEDTAを有する標準的緩衝液:マニエラス)を0.5mgの粒子(6×SSPEで予め洗浄したもの)に添加し、室温で15分間ローラー・ミキサー(コールター)に入れた。

6×SSPEで2回洗浄した後、シンチレーション計測によって結合した<sup>14</sup>C-ビオチンの割合を測定した。

#### デオキシオリゴヌクレオチド

アプライド・バイオシステム・381A DNAシンセサイザ上でデオキシオリゴヌクレオチドを合成した。

化学薬品はアプライド・バイオシステム社から購入した。アミノリンクIIを使用して、5'アミノ改変デオキシオリゴヌクレオチドを製造した。

使用した免疫グローブリンカッパ絆縫プローブは、

5'-TCACTGGATGGGAAAGATGGATACAGTTGGTGCA-3'

であった。

#### プローブのビオチニル化

提供者によって推奨されたように、ビオチンXNESエステル【クロントック(Clonetec)のE-ビオチニル-L-カブコン酸のL-スクシンイミジル】を使用した。

90μlの水中の0.1μmol NH<sub>2</sub>-改変オリゴ(dT)<sub>25</sub>を10μlラベル付け緩衝液(1Mトリウム炭酸水素塩/炭酸塩、pH 9.0)に添加し、搅拌した。

最後に、ジメチルホルムアミド中25μlのビオチンXNESエステル(100ng/ml)を添加して室温で一晩保った。

過剰のラベル付け剤と緩衝液を、セファデックスG50スピンドラム(Sephadex G50 spin column)中で除去した。

Klenowのポリメラーゼ、α-[<sup>32</sup>P]-dITP、及びテンプレートとしてオリゴ(dA)<sub>25</sub>による充填反応を使用して、5'ビオチンオリゴ(dT)<sub>25</sub>を末端ラベル付け(labelled)した。過剰のラベルをセファデックスG50スピンドラムを使用して除去した。

#### オリゴ(dT)ダイナビーズ(T-ビーズ)の製造

2.5ml 6×SSPE中の200μgビオチニル化オリゴ(dT)<sub>25</sub>(24nmol)を、50ngの予め洗浄したダイナビーズM-280ストレプトアビシンと混合し、室温で15分間ローラー・ミキサー上で保った。

6×SSPE中で2回洗浄した後、ビーズを6×TE、0.1%SDS中4°Cで保存した。

#### オリゴヌクレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のバッチのハイブリッド形成能力を測定するための標準的分析において、エッペンドルフ(eppendorf)管中の0.1mgのビーズを6×SSPE、0.1%SDSで1回洗浄した。マグネットラック(MPC-I、ダイナルI.S.、オスロ)を各工程間に粒子を凝集させるのに使用した。

洗浄用緩衝液の除去後、50pmolのオリゴ(dA)<sub>25</sub>を含むハイブリッド形成溶液(6×SSPE、0.1%SDS)を添加した。

種やかに搅拌した後、管を室温で2分間放置してハイブリッド形成させた。ハイブリッド形成した粒子を室温で2×SSPE、0.1%SDSを用いて2回洗浄し、オリゴ(dT)<sub>25</sub>、ダイナビーズに対してハイブリッド形成したオリゴ(dA)<sub>25</sub>のパーセントをシンチレーション計測器で測定した。

#### オリゴmRNAトレーサーのラベリング

3'mRNA<sub>25</sub>テールを有する1μgの1200 bp mRNA(プロメガ)を、10μl 5×Klenow緩衝液、1 μl RNAsin( RNasin)、10mM DDT中の2.5pmolオリゴ(dT)<sub>25</sub>と混合した。室温で2分後、10μCi α-[<sup>32</sup>P]-dATP、1 μl Klenowポリメラーゼ(アマーシャム)及び50μlまでの水を添加し、15°Cで60分間保温を続けた。過剰のα-[<sup>32</sup>P]-dATPを、セファデックスG50スピンドラムを使用して除去した。

#### オリゴ(dT)<sub>25</sub>と結合したダイナビーズM-280ストレプトアビシンに対するオリゴmRNAハイブリッド形成用緩衝液

##### オリゴ(A)結合緩衝液:

0.5M LiCl、10mMトリス・Cl、pH 7.5、1 mM EDTA、

#### 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム:

##### 中性洗浄緩衝液:

0.15M LiCl、10mMトリス・Cl、pH 7.5、1 mM EDTA、  
0.1%ドデシル硫酸ナトリウム。

溶出緩衝液: 2mM EDTA、0.1%SDS。精製mRNAのその後の用途に応じて、最後の洗浄工程と溶出緩衝液中のSDSを省略できる。

##### mRNAの抽出

培養細胞からの全mRNAの抽出は、オーフレイ(Auffrey)とローラー・ルージュ(rougeon)のプロトコル([1980, Eur. J. Biochem., 107, 303~314])に従って、サルコシル(sarcosyl-)法、LiCl法、尿素法を使用して行った。

#### mRNAカップリングとハイブリッド形成能力

本試験において使用したダイナビーズM-280-ストレプトアビシンは、粒子1mg当たり290pmolの<sup>14</sup>C-ビオチンに結合したことが判明した。

結合した<sup>14</sup>C-ビオチニル化オリゴ(dT)<sub>25</sub>の量は、カップリング反応中にラベル付けしたトレーザーを使用して測定し、粒子1mg当たり250pmolのビオチンオリゴ(dT)<sub>25</sub>であることが判明した。

これらの磁性オリゴ(dT)<sub>25</sub>、粒子の最大ハイブリッド形成能力を決定するため、材料と方法において記載したような(dA)<sub>25</sub>オリゴヌクレオチドを使用する標準分析を計画した。

本試験において製造し使用したT-ビーズのバッチは、193pmolオリゴ(dA)<sub>25</sub>/bgのハイブリッド形成能力を有していることが判明した。

非特異的結合を測定するための対照実験において、非特異的プローブ(42mer TaqIIプローブ)とカップリングした粒子は、粒子1mg当たり10attmolオリゴ(dA)<sub>25</sub>未満しか結合しなかった。

#### オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成速度論

磁性のmRNA単離実験を開始する前に、この系のハイブリッド形成速度論を研究することが必要であった。

粗略的オリゴ(dA)<sub>25</sub>型のヌクレオチドに対して2倍過剰示満のT-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成実験を組み立てた。

## 特表平4-501959

第1図が示すように、ハイブリッド形成は1分以内に完了した。

### オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成効率

どの程度効率的に標的核酸が混合液から分離できるかを試験するために、本発明者らは2つの異なる実験を組み立てた。

第1の実験においては、徐々に量を増やしながら数つかの量の標的のオリゴヌクレオチド（オリゴ(dA)<sub>n</sub>）を、公知の最大ハイブリッド形成能力19pmolを有する固定量（100μg）のT-ビーズに添加した。第2A図中の結果は、標的対ビーズ能力のモル比が1：1に近づいた場合でも、T-ビーズは少なくとも99%の標的のオリゴヌクレオチドと結合できることを示している。

第2の実験においては、1pmolから100nmolまでの5つ異なる濃度のオリゴ(dA)<sub>n</sub>を100μgの粒子のアリコートに添加した。各混合物中に存在する核酸の全量を、既知のオリゴヌクレオチドを含むプローブで10pmolまで固定した。標的オリゴヌクレオチドを含まない陰性対照実験においては、非特異的結合を検知できるように、非標的のプローブをラベル付けした。2分間のハイブリッド形成後、2段階の洗浄工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(dA)<sub>n</sub>の量を測定した。第2B図中の結果は、100nmolのような低い標的オリゴヌクレオチド量（存在する全核酸の0.001%）でも、既知オリゴ(dt)<sub>n</sub>粒子は95%以上を引き出すことを示した。

### ポリアmRNAの粗気的単離

(G1)：ダイナビーズがポリアmRNAを結合する能力、効率、および速度論を、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に関して記載したような類似の1種の実験を組み立てることによって研究した。

T-ビーズの最大T-A mRNA結合能力を決定するために、3'末端に30個のAを有する1200ヌクレオチドカナマイシン転写物（プロメガ）である公知の濃度の<sup>32</sup>P-ラベル付けされた対照RNAを使用した。結合能力を決定するための方法は、オリゴヌクレオチド結合分析に関して記載したと同様であるが、上述のハイブリッド形成緩衝液を使用した。

この特定のポリアmRNAの結合能力は、T-ビーズ 1mg当たり 33pmol(12 μg)のmRNAであることが判明した。

### T-ビーズに対するポリアmRNAのハイブリッド形成の速度論と効率

オーフラーらの上述の方法を使用して、ハイブリドーマ細胞系（line）AB1(1)の1×10<sup>6</sup>細胞から全RNAを抽出した。オリゴ(dt)粒子に対するmRNAハイブリッド形成の速度論を、10μgの全RNAを微量の<sup>32</sup>P-ラベル付けされたマウスの脾臓ポリアmRNA（Clontech）とともに、そして150μlのハイブリッド形成緩衝液中の約5倍過剰のT-ビーズ能力を使用して、決定した。第3図中の結果は、サンプル中のポリアmRNAの90%近くが2分以内にビーズに対してハイブリッド形成し、また30秒後には78%が既にハイブリッド形成していることを示している。

### 細胞質からのポリアmRNAの直接粗気的単離

ハイブリドーマ細胞系AB1の培養液からの10<sup>6</sup>細胞を1度洗浄し、50μl PBS [ダルベッコ(Dulbecco), 041-04190] 中に再分散させ、トリトン(X-100)を0.5%の最終濃度まで添加した。1分間の溶解(Lysis)の後、核酸を含む細胞デbrisを、エッペンドルフ(Eppendorf) 遷心分離槽中で10秒間スピinnさせてペレット化した。上澄液を、2倍濃度の100ハイブリッド形成緩衝液中のT-ビーズに添加し、2分間放置してハイブリッド形成させ、その後粒子を磁気的に凝集させた。ハイブリッド形成したmRNAを2mM EDTAで粒子から離し、粒子を磁石を使用して除去した。この実験においては、10<sup>6</sup>ハイブリドーマ細胞のアリコートを、可変量、200μg、100μg、50μg、20μg、のT-ビーズと、プローブなしの200μgのダイナビーズR280-ストレプトアビジンに添加した。T-ビーズから離した後、ポリアmRNAのノーザンプロット(Northern blots)からのX線フィルムをデンシトメーターでスキャンし、免疫グローリングを用いて検査した。これらの結果は、mRNAの収率がビーズの量が増加するとともに増加し、一方上澄液中の残存mRNAがそれに対応して減少することを示している。第4図中に提示されている結果は、約120μgのT-ビーズが10<sup>6</sup>細胞からの細胞質ポリアmRNAの90%よりも多くを単離するのに十分であることを示している。図中の記号—△—は粒子に対するハイブリッド形成を表し、記号—○—は上澄液中に残存しているmRNAを表す。プローブを有していないストリップアビジン粒子は検知可能なmRNAを表す。

合を与えるなかった。

### 実験例6

#### 真核細胞系「ラジ(Raji)」（スウェーデン、ストックホルムのジー・クレイン教授(Dr. G Klein)から供給された）からのmRNAの精製

オーフラーらによってEur. J. Biochem. 107, 503~514(1980)に記載されている方法によって、1×10<sup>6</sup>細胞から全RNAを抽出した。この方法に従って、0.5mlの細胞ペレットを、5ml氷冷溶解(lysis)緩衝液(3M LiCl, 6M尿素、0.1%サルコシル(sarkosyl), 0.1M 2-メルカプトエタノール、50Mトリス-HCl, pH 7.4、5mM EDTA)に添加した。その後、混合物を粗音波処理し、氷上で一晩保持した。

翌日、分解液を17,000gで20分間遠心分離した。ペレットを速やかにTE-SDS(10mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5%SDS)に溶解させ、同容積のフェノール-クロロホルム(1:1)で1回抽出し、その後クロロホルムのみでもう1回抽出した。分解液を3倍容積のエタノールと1/10容積の3M NaAcと混合し、10のバッチに分割し、そして使用するまで-20°Cで保存した。

1×10<sup>6</sup>細胞に相当する全RNAのバッチの1つに、マニアチスによって1582に197~198頁に記載された方法に従って、オリゴdtセルロース(ファルマシア)を使用する従来のmRNA精製法を施した。

全RNAのもう1つのバッチを以下のmRNA精製方法において使用した。

DNA合成活性（アプライド・バイオシステムズ製）によって製造された、構造 $\delta$ (NH<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-6ACCTTGGEATTCCCGGGCTGCAGT-(T)<sub>n</sub>を有するBETと命名されているDNAプローブを、20ngのE502粒子、50μgの前記DNAプローブ、2.5mlの0.1Mイミダゾール緩衝液pH7.0中の48ngのKDC(シグマ製)と混合することによって、(前述の)カルボキシミド法によって磁性粒子E502に結合させた。一晩保持し、T1(上述のもの)で2回粒子を洗浄し、0.2M NaOH、0.5M NaCl中で1回失活して8pmolのオリゴA<sub>n</sub>プローブにハイブリッド形成する能力のある粒子にした。0.1ngの粒子を100pmolのA<sub>n</sub>プローブ(キナーゼ反応によって<sup>32</sup>P-ラベル付けされている)と6×SSPE中で10分間保持することによって、ハイブリッド形成能を測定した。22°C(融点よりも12°C低い)において

6×SSPEで2回粒子を洗浄した後、全抽出液に対するハイブリッド形成したA<sub>n</sub>の割合をシンチレーション計測器で測定した。

### mRNA精製の陰性対照として、配列

$\text{NH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_5\text{-}^5\text{NH}\text{-}(\text{CH}_2)_5\text{-TTAATTATCACTTAACGCTTCGACTTTGGGGTCAAGGA}$   
 $\text{AAAACC } 3'$ を有しInと命名されている既知のプローブを上述の方法によって粒子と結合させた。

Raji(Raji)mRNAトレーサーを、0.1μgを用いて放射性ラベル付けることによって調製し、mRNAを上述の従来法によって精製した。ラベル付けは、10μl 5×Klenowポリメラーゼ緩衝液(0.25M NaCl, 0.25M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.5, 5mM EDTA)中15°Cで10分間、1pmolのBET-プローブをmRNAに対してハイブリッド形成されることによって行った。10μl C1-<sup>32</sup>PdATP(アマーシャム)、2単位のKlenowポリメラーゼを(BET)をこの混合物に添加し、これを50μlまで水で希釈した。2時間保持した後、混合物をセファデックスG50(ファルマシア)に通して取り込まれなかったヌクレオチドを除去した。

mRNA精製実験は以下のように行った。

BETプローブを有する粒子1mgを、100μl 6×SSPE中100,000cpmのトレーサー- mRNAとともに、B細胞系ラジからの全RNAの20μgに添加した。

同じ実験を行ったが、粒子はIn-プローブを有していた。

ハイブリッド形成は温湯でローラーマシン(roller machine)上で行った。ハイブリッド形成反応の後、短い間隔で、磁石によって粒子を凝聚させ、上澄液中の残存放射能を測定した。各測定の後、粒子をすぐに再分散させた。

10分後、mRNAの60%がBETプローブを有する粒子に結合した。対照粒子は検知可能な量のmRNAを結合しなかった。

30分間の保持後、粒子を温湯で500μl 2×SSCで2回洗浄し、100μl TE-緩衝液中に再分散させ95°Cで5分間加熱し、粒子を凝聚させ、上澄液を回収し、-70°Cで保存した。

### 実験例7

本発明の方法を、本発明者らの研究所でクローン化したリシン(ricin)A連鎖子の5'末端の塩基配列決定を行うために使用した。

## 特表平4-501959

BamH<sub>I</sub>断片上のリシンAをpUC8中にクローン化した。この遺伝子の3'末端は以前に配列決定されている。プラスミドpAL400をSalI及びEcoRIを用いて切断し，Klenowポリメラーゼを使用して、存在する唯一のヌクレオチドとしてのビオチン-dUTPでビオチニル化した（マニアチス，112~1116頁を参照のこと）。ビオチンはSalI部位においてのみ取り込まれる。第1のプライマーは公知の配列データに基づくものであり、5'-TGA-ATT-GGA-C7-GCA-AAG-3'であった。

取り込まれなかったビオ-dUTPを除去するために、G-50セファデックススピングカラムを使用して材料を精製し（マニアチス160頁）、エタノールで沈殿させた（エタノールによる沈殿はおそらく省略できる）。ビオチニル化された二重鎖DNAを含む混合物を、TE緩衝液（10 mMトリス-HCl及び1 mM EDTA, pH 8.0）中のストレートアビジン/アビジン被覆磁性粒子と、室温で30分間導かに反転（inversion）させて、混合した。10 μlの粒子（250g粒子/ml）当たり2 μgのビオチニル化DNAを使用した。

結合したビオチニル化二重鎖DNAを0.15 M NaOH中室温で5分間酸性させた。一度脱DNAを有する粒子を磁石を使用して回収し、TE緩衝液中で1回洗浄した。

### 配列決定反応

配列決定用プライマーのアニーリング：

2 μlの10 × 反応/ハイブリッド形成液（100 mMトリス pH 8.0、50 mM MgCl<sub>2</sub>）

1 μlの17merプライマー（1.2 μg/ml）

7.0 μl蒸留水

を含む混合物を粒子に添加し、55°Cで5分間保持し、その後ゆっくりと室温まで冷却した。

アニーリした粒子テンプレート-プライマーに以下のものを添加した。

[α<sup>32</sup>P] dATP<sub>S</sub> 1.5 μl (sp. act. 600 Ci/mmol)

Klenow 1.0 μl (4 U/μl)

BSA 1.0 μl (100 μl/100 μg/ml)

<sup>32</sup>Pを代わりに使用できる。

全混合物を、A、G、C、及びTとラベル付けされた、4つの質量遮蔽分離チューブ又はマイクロタイタープレートのウェル（well）に分配した。即ち、（粒子の体積のために）各々4 μlずつに分けた。

4 μlの適当なヌクレオチドを各チューブ/ウェル混合物、即ち、Aミックス（mix）、Gミックス、Cミックス、及びTミックスに添加した。

Aミックス： 100 μM dGTP、dGTP、dCTP及び

100 μM ddATP

Gミックス： 5 μM dGTP； 100 μM dTTP、dTTP及び

12 μM ddGTP

Cミックス： 100 μM dGTP、dTTP； 10 μM dCTP及び

100 μM ddCTP

Tミックス： 100 μM dGTP、5 μM dTTP、100 μM

dCTP 及び 500 μM ddTTP

混合物を室温で15分間放置して保った。

ジデオキシヌクレオチドで停止されていない全ての組の完全な合成を、125 μMの各ヌクレオチドを含む2 μlのデオキシヌクレオチド溶液、pH 7.5、を添加し、15分間さらに保持することによって行った。

5 μlのホルムアミド色素を添加して反応を停止させ、沸騰水中で3分間加熱して、粒子からのラベル付けされたDNAを変性させた。その後、粒子テンプレートを磁気的に分離し、ラベル付けされたDNAを含む2 μlの1:四塩化銀溶液勾配列決定用ゲル（buffer gradient sequencing gel）[アーマーシャム（Amersham）からのプロトコール（Protocol）]に入れた。

テンプレートを有する粒子は洗浄後再使用でき、前の配列決定からの配列決定結果に基づく新しいプライマー用にされる。

最初のプライマーは公知の配列データ、即ち、

5'-TGA-ATT-GGA-C7-GCA-AAG-3'に基づいた。

2つの次のプライマーは、この実験からの以下の配列データに基づいた：

プライマー-2 5'-G-6-ACA-TAC-CCT-CTA-G-3'

プライマー-3 5'-GCT-CTG-CAT-GAT-TTG AG-3'

これら3つのプライマーを使用することによって、リシンA遺伝子中の最初の7500の塩基の配列決定が可能であった。

対照として、M13を使用して同じ遺伝子の配列決定を行った。同じ結果が得られた。

### 実施例8

#### PCR増幅テンプレートを使用する四相DNA均基配列決定

磁性粒子上のストレートアビジンへのビオチンによる不動化の前に標的の配列をPCR法によって増幅したことを除いて、固相基配列決定を、前に概略を説明した技術に従って行った。合成ヒプロインシュラン遺伝子断片を含むプラスミドpKE127でS. coli K12 115株を形質転換させ、寒天培地上平板培養した。滅菌されたバストールビベットで単一コロニーを取り、67 mMトリス-HCl、pH 10.00、16.6 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.7 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM β-メルカプトエタノール、及び170 μg/ml BSAから成るPCR緩衝液10 μl中に懸滴させた。サンプルを95°Cまで5分間加熱し、室温まで冷却した後、1 μlの10 × PCR緩衝液、pH 7.0、を添加して中和した。

マルチーリンカー領域の上流領域（ビオチン-CCATGATTACCGAATTAAATAC-3'）及び下流領域（5'-TTGATATACTGGTAACCAACACTCATGTCATGG-3'）のそれぞれに相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用してPCRを行った。製造者（スウェーデンのファルマシア）が記載しているように上流プライマーを5'末端においてビオチニル化した。

反応混合物（100 μl）は、上述のPCR緩衝液、pH 8.6、1 μlの各プライマー、各200 μMのdATP、dCTP、及びdTTP、及び上述の10 μlの分解物サンプルから成っていた。2単位のTaqI-ポリメラーゼ（英国のアーマーシャム）を添加し、テクニ・プログラマブル・ドリープロック（Techno programmable Dri Block）PCR-1【テクニ、英國】を使用して、温度サイクル反応を行った。各サイクルは、82°Cでの1分間の変性工程、その後の50°Cでの2分間のDNAに対するプライマーのアニーリング、及び72°Cで1分間のTaqI-ポリメラーゼによるDNA鎖の伸長を含んだ。反応混合物を1滴のパラフィン油でカバーした。20サイクル後、混合物を100 μlのストレートアビジン被覆磁性粒子に添加した。

上溶液を除去し、不動化された二重鎖DNAを27°Cで0.15 M NaOHで15分間保持することによって一度脱離形態に転換した。不動化されたテンプレートDNAを有するアビジン被覆粒子を、残りの0.15 M NaOHとTE緩衝液で洗浄した。

マルチーリンカー領域からすぐ下流の領域に相補的な、蛍光末端ラベル付けされた配列決定プライマー（5'-CCTTGTAAACGCCGCACT-3'）を使用して、配列決定反応を行った。2 μlの配列決定用プライマーを、粒子に不動化されたテンプレートDNAと、10 mMのトリス-HCl（pH 7.5）、10 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μg/ml BSA及び100 mMのNaClを10 μlの全容積まで含む緩衝液中で混合した。アニーリング混合物を65°Cで加熱し、室温まで冷却させた。1 μlのDTT/NaCl混合物（0.8 M NaCl/0.1 M DTI）及び4単位のT7-ポリメラーゼ（ファルマシア、スウェーデン）を添加し、容積を15 μlに調整した。その後、この混合物の3.5 μlのアリコートを2.5 μlの各ヌクレオチド混合物と混合し、87°Cで10分間保持した。以下のヌクレオチド混合物を使用した：各々80 μMのdATP、dCTP、dTTP、dTTP、6.8 μMの各ddATP、50 mMのNaCl、及び40 mMのトリス-HCl pH 7.5。伸長（extension）反応の完了後、各反応の上溶液を除去し、ストレートアビジンアガロースを水で洗浄した。10 mM EDTA、pH 7.5、0.3%（v/v）キシリソニアノール（並びに0.3%（v/v）ブロムフェノールブルーを含む脱イオン化ホルムアミドから成るホルムアミド/配列決定用色素の3 μl）を使用して、新しく合成されたオリゴヌクレオチドを溶解させた。37°Cで15分間保持した後、上溶液を除去し、3 mlの水で希釈した。電気泳動（12）中に蛍光バンドを被検するように設定した自動化核酸基配列決定装置に約2 μlを入れた。20 cmの分離長さ、及び7%ボリアクリルアミドゲルによる配列決定実験が明確な結果を与えた。この例は、PCR増幅されたDNAが磁性粒子上に不動化でき、T4 DNAポリメラーゼと蛍光プライマーを使用して配列決定できることを示している。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**